



# **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE**

SCUOLA DI DOTTORATO IN NEUROSCIENZE DI BASE E APPLICATE  
(ciclo XXI)

CORSO DI DOTTORATO:  
LA PATOLOGIA VASCOLARE DEL DISTRETTO TESTA-COLLO

Coordinatore: Prof. Lucio Rucci

## **RETINOPATIA DEL PRETERMINE STADIO 3 POSTERIORE: VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA A BREVE TERMINE DI INIEZIONI INTRAVITREALI DI BEVACIZUMAB, ISOLATE O ASSOCIATE A LASERTERAPIA SEGMENTALE**

*Il Coordinatore del Corso*  
(Chiar.mo Prof. Lucio Rucci)

*Il Tutor*  
(Chiar.mo Prof. Ugo Menchini)

---

Tesi di dottorato  
del Dott. Saverio Frosini

---

Settore scientifico-disciplinare:  
MED/30 (Malattie dell'Apparato Visivo)

**Anno Accademico 2007-'08**

# Indice

---

<b>1 – INTRODUZIONE .....</b>	<b>5</b>
CENNI STORICI.....	7
SVILUPPO STORICO DELLE ACQUISIZIONI FISIOPATOLOGICHE .....	10
<b>2 – ANATOMIA EMBRIO-FETALE E NEONATALE .....</b>	<b>14</b>
CENNI DI EMBRIOLOGIA DELL'OCCHIO UMANO .....	15
SVILUPPO EMBRIO-FETALE DELLA VASCOLARIZZAZIONE RETINICA .....	17
<b>3 – FISIOPATOLOGIA .....</b>	<b>21</b>
FISIOPATOLOGIA DELLA RETINOPATIA DEL PRETERMINE .....	22
RUOLO DEI FATTORI OSSIGENO-REGOLATI.....	25
RUOLO DEL VEGF NELLA ROP.....	25
INCREMENTO DEL VEGF NELLA FASE II DELLA ROP .....	27
SOPPRESSIONE DEL VEGF NELLA FASE I DELLA ROP .....	28
NEUROPROTEZIONE FORNITA DAL VEGF .....	28
RUOLO DEI FATTORI NON-OSSIGENO-REGOLATI .....	30
RUOLO DEL GH E DELL'IGF-1 NELLA PATOGENESI DELLA ROP .....	30
RUOLO DELL'IGF-1 NELLA FASE I DELLA ROP .....	31
RUOLO DELL'IGF-1 NELLA FASE II DELLA ROP.....	32
INTERAZIONI TRA VEGF E IGF-1 NELL'EVOLUZIONE DELLA ROP.....	33
RUOLO DELLE CELLULE GLIALI .....	34
CENNI SULLE INFLUENZE GENETICHE NELLA ROP .....	35
CENNI SUL RUOLO DEI RADICALI LIBERI.....	36

(segue)

*(segue Indice)*

<b>4 – LA RETINOPATIA DEL PRETERMINE.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 – EPIDEMIOLOGIA .....</b>	<b>39</b>
DISTRIBUZIONE NEL MONDO.....	39
INCIDENZA IN ITALIA .....	41
INCIDENZA IN TOSCANA .....	42
INCIDENZA LOCALE (SOD NEONATOLOGIA AOUC).....	42
<b>4.2 – CLASSIFICAZIONE .....</b>	<b>44</b>
LOCALIZZAZIONE .....	44
ESTENSIONE .....	45
STADIAZIONE.....	46
CLASSIFICAZIONE ICD-9-CM .....	52
<b>4.3 – DIAGNOSI.....</b>	<b>53</b>
OFTALMOSCOPIA BINOCULARE INDIRETTA .....	53
RETINOGRAFIA DIGITALE.....	54
NUOVI SVILUPPI NELLA DIAGNOSI DELLA ROP .....	56
<b>4.4 – SCREENING .....</b>	<b>59</b>
RACCOMANDAZIONI DERIVANTI DAL JOINT POLICY STATEMENT AAO-AAP- AAPOS 2006 .....	59
NUOVI CRITERI PER LA SELEZIONE DEI NEONATI A RISCHIO DI ROP .....	63
<b>4.5 – APPROCCI STORICI E CORRENTI AL TRATTAMENTO DELLA ROP .....</b>	<b>66</b>
COMMENTO .....	72
<b>5 – OBIETTIVI DELLO STUDIO .....</b>	<b>74</b>
<b>6 – MATERIALI E METODI .....</b>	<b>76</b>
LOCALIZZAZIONE E STADIAZIONE.....	78
TRATTAMENTI .....	79
<b>7 – RISULTATI .....</b>	<b>83</b>
<b>8 – DISCUSSIONE .....</b>	<b>88</b>
<b>9 – CONCLUSIONI .....</b>	<b>98</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>105</b>

## Indice delle figure e delle tabelle

### *Figure*

---

2.1: embriogenesi dell'occhio	15
2.2: embriogenesi dell'occhio	16
2.3: Mappe topografiche di cellule fusiformi e cordoni vascolari nella retina	19
2.4.a: Rappresentazione schematica della retina (sezione)	20
2.4.b: A. ialoidea, ramo dell'a. centrale retinica	20
3.1: Ruolo del VEGF nella vasculogenesi e nell'angiogenesi embrio-fetale	22
3.2: Ruolo dell'IGF-1 e del VEGF nella fase I e II della ROP (modello OIR)	24
3.3: Rappresentazione schematica dei fattori angiostatici e proangiogenici	27
4.1.1: Distribuzione della ROP in Italia	41
4.2.1: Schema della localizzazione della ROP	45
4.2.2.a: ROP 1	46
4.2.2.b: ROP 1	47
4.2.3: ROP 2	47
4.2.4: ROP 3 severa	48
4.2.5.a: ROP 4A	49
4.2.5.b: ROP 4B	49
4.2.6.a: ROP 5	50
4.2.6.b: ROP 5	50
4.2.7: plus disease	51
4.2.8: AP-ROP	51
4.3.1.a-b-c: Oftalmoscopia binoculare indiretta in isolet	53
4.3.2: RetCam II	54
4.3.3.a: RetCam II: testa ottica	55
4.3.3.b: RetCam II: angolo di esplorazione	55

*(segue)*

*(segue Indice delle Figure e delle Tabelle)*

4.3.4.a: ROPtool	57
4.3.4.b: ROPtool	57
4.3.5: Interfaccia del software ROPtool	58
6.1: Trattamenti: iniezione intravitreale; laser	80
6.2: Medicazione postoperatoria	81
7.1.a: Caso 1. OD.	86
7.1.b: Caso 1. OD.	86
7.2.a: Caso 3. OD.	87
7.2.b: Caso 3. OD.	87
7.2.c: Caso 3. OD.	87
7.2.d: Caso 3. OD.	87
7.3.a: Caso 4. OS.	88
7.3.b: Caso 4. OS.	88

## ***Tabelle***

---

Tab. 4.1-I: Incidenza della ROP negli arruolati ETROP	41
Tab. 4.1-II: incidenza della ROP presso TIN AOUC	42
Tab. 4.4-I: Temporizzazione della prima valutazione oftalmologica	61
Tab. 6-I: Dati dei pazienti trattati	79
Tab. 6-II. Protocollo dei tempi per i trattamenti laser e anti-VEGF intravitreali	82

---

## 1 – Introduzione

---

La Retinopatia del Pretermine (*retinopathy of prematurity*, ROP), è un disordine angio-vasculoproliferativo retinico che colpisce esclusivamente neonati pretermine. Nelle forme più severe, essa esita in deficit visivi gravi e cecità, entrambi recanti alti costi socio-sanitari, oltre a costi individuali elevatissimi in termini di sviluppo neuro psicomotorio, linguistico-cognitivo e socio-relazionale, i quali risultano amplificati e particolarmente significativi all'inizio della scolarizzazione, ma che gravano il soggetto per tutta la vita.

### CENNI STORICI

Fu notato già negli anni '30 che le nascite dei bambini prematuri con esito in sopravvivenza sarebbero potute essere percentualmente ben più elevate se avessero avuto il modo di ricevere l'integrazione dell'ossigeno dopo la nascita.

L'associazione fra estrema prematurità e “iperplasia fibroblastica della guaina vascolare persistente al di dietro di ciascun cristallino” fu descritta per la prima volta nel 1942 da Terry col termine, appunto, di fibroplasia retrolentale (FRL)<sup>1</sup>. All'epoca, quella che venne poi chiamata la retinopatia dei prematuri venne attribuita a diverse cause: infezione primaria o trasmessa al neonato dalla madre, carenza di vitamina E, anossia. Kinsey e Zacharias, per primi, riportarono dati retrospettivi che chiamavano in causa l'ossigeno, le vitamine ed il ferro nell'aumento di incidenza della FRL<sup>2</sup>.

L'ossigeno era diventato liberamente disponibile appena prima e durante la seconda guerra mondiale in conseguenza della sua necessità per i trasporti aerei ad alta quota; l'ossigeno-terapia divenne pertanto disponibile nella pratica clinica.

L'ossigeno-terapia “intensiva” e la conseguente iperossia furono postulate come possibili cause della fibroplasia retrolentale soltanto nel 1952, quando vennero poste in relazione alla aumentata incidenza della fibroplasia retrolentale (Campbell, Crosse, Evans)<sup>3-5</sup>. Ashton e collaboratori riprodussero le alterazioni della FRL sottoponendo gatti neonati all'inalazione di alte concentrazioni di ossigeno<sup>6-8</sup>. Nonostante diverse ricerche condotte sulle cause e sui metodi per prevenire o bloccare travagli pretermine, negli anni compresi tra il 1950 ed il 1990 la percentuale delle nascite di

bambini con basso peso (*Low Birth Weight* - LBW) rimase relativamente stabile su valori compresi tra il 6.8% e l'8%.

Nel 1956 fu condotto e pubblicato un ampio studio multicentrico randomizzato controllato, coordinato da Kinsey, sull'ossigeno-terapia; esso dimostrò che l'incidenza di FRL era maggiore nei casi sottoposti a supplementazione incontrollata di O<sub>2</sub> rispetto ai neonati che ne ricevevano solo lo stretto necessario ad evitare la comparsa di ipossia clinicamente grave (cianosi)<sup>9</sup>. Anche Patz e Lanman dimostrarono la ridotta incidenza della FRL nei neonati trattati con basse concentrazioni di ossigeno<sup>10,11</sup>.

L'applicazione clinica di tali evidenze condusse ad una drastica diminuzione dell'incidenza di FRL (o di ROP, come venne poi definita). Parve, all'epoca, che la ROP fosse una patologia iatrogena causata dall'ossigeno supplementato a scopo terapeutico e che fosse prevenibile. Tuttavia, l'applicazione acritica di tale strategia di gestione del prematuro, basata essenzialmente sulla limitazione della supplementazione di ossigeno fino ad una concentrazione massima del 40%, risultò in un marcato incremento della mortalità e della morbidità neurologica nei neonati di basso peso, dato che molti di essi richiedevano concentrazioni superiori per gestire la RDS (o sindrome da *distress* respiratorio).

Il pendolo oscillò nuovamente, durante gli anni '60, verso strategie più "liberali," anche se meglio controllate, di supplementazione di ossigeno, con misurazioni intermittenti dei gas ematici per aggiustare la supplementazione rispetto alle necessità metaboliche del neonato.

Numerosi e successivi approcci nella cura dei neonati portarono ad un notevolissimo aumento del tasso di sopravvivenza dei prematuri con LBW durante i successivi 40 anni.

Il più marcato aumento nella percentuale di sopravvivenza è avvenuto nella categoria dei neonati ELBW (*Extremely Low Birth Weight*), passata dal 6% tra il 1950 ed il 1954 al 26% tra il 1973 ed il 1975, con alcuni centri che riportano percentuali di



sopravvivenza del 50% dei bambini con peso alla nascita compreso tra i 500 ed i 1.000 g nel 1987-1988.

Durante gli anni '70 e '80 l'avvento del monitoraggio continuo dell'ossigeno mediante elettrodi prima intravascolari e successivamente transcutanei generò la convinzione che la ROP fosse, finalmente, un problema del passato. Tuttavia, il miglioramento delle procedure di terapia intensiva neonatale condusse ad un aumento della sopravvivenza di neonati fortemente pretermine; la crescente immaturità di tali neonati ne provocò l'esposizione a livelli molto più elevati di rischio di ROP e la patologia emerse di nuovo come problema clinico significativo. Durante gli anni '90 la percentuale di nascite pretermine aumentò del 15.6% (dall'8.8% al 10.2%) negli anni compresi tra il 1989 ed il 1997 nei bianchi, mentre nella popolazione nera fu osservato un calo del 7.6% (dal 19.0% al 17.5%). Branum e Schoendorf notarono che tra il 1981 ed il 1998, la percentuale di nascita pretermine aumentò del 23% nei bianchi e del 3% nei neri<sup>12</sup>.

Nel 1989 Aylward e colleghi ultimarono una meta-analisi di 80 saggi pubblicata durante gli anni '80. Essi affermarono che il gruppo dei LBW aveva uno sviluppo del quoziente d'intelligenza significativamente più basso rispetto al gruppo di controllo (97.8 vs 103.8). Comunque, non fu riscontrata una differenza nelle medie dei risultati sullo sviluppo dei quozienti d'intelligenza (IQ/DQ) fra neonati LBW, VLBW (*very low birth weight*), e sottogruppi di ELBW<sup>13</sup>.

Durante gli anni '90, l'uso molto esteso dei surfactanti aumentò ulteriormente le percentuali di sopravvivenza, sia dei LBW, che dei VLBW e ELBW.

Ulteriori elementi eziopatogenetici derivarono da alcuni studi disegnati per valutare l'efficacia di diversi approcci terapeutici (v. oltre per aggiori dettagli). Nel 1988 prese avvio il primo trial multicentrico randomizzato (RCT, *randomized controlled trial*) per la terapia della ROP, denominato CRYO-ROP in quanto disegnato per valutare gli effetti del trattamento sottrattivo della retina avascolare periferica contro non trattamento<sup>14,15</sup>. Nel 1991 fu condotto un altro studio (LASER-ROP)<sup>16</sup>, volto a testare l'efficacia dell'ablazione laser. Nel 1998 prese il via – ma fu presto

abbandonato – il LIGHT-ROP, che valutò l'influenza della restrizione dell'esposizione alla luce sulla incidenza di ROP<sup>17,18</sup>. Nel 2000-2002 fu condotto l'ETROP (*Early Treatment for ROP*), RCT che valutò l'efficacia di un trattamento crioablativo convenzionale (secondo i criteri CRYO-ROP) contro un trattamento crioablativo più precoce, volto a trattare le cosiddette *threshold* ROP - alcune ROP, cioè, di gravità minore rispetto alla soglia fissata per il trattamento nel CRYO-ROP –  
19 .

Da allora, le sole informazioni aggiuntive da RCT disponibili provengono da dati a distanza derivanti dagli ultimi due RCT citati.

## **SVILUPPO STORICO DELLE ACQUISIZIONI FISIOPATOLOGICHE**

I neonati - ed i bambini in generale - sono affetti da neovascolarizzazione retinica in numero inferiore rispetto agli adulti; tuttavia, oggi sappiamo che la ROP offre un modello osservazionale interessante per la comprensione dei meccanismi fisiopatologici delle retinopatie; lo studio della ROP ha contribuito a sviluppare trattamenti conservativi delle retinopatie dell'adulto.

In teoria, la ricerca sulla ROP è più semplice che nella retinopatia diabetica o nella AMD (*Age-related Macular Degeneration*), dato che si possono compiere delle chiare e distinte osservazioni differenziali fra il normale sviluppo in utero e lo sviluppo che si verifica dopo una nascita prima del termine fisiologico della gravidanza. Comprendere quali fattori differenziano il normale sviluppo retinico in utero rispetto a quello che si verifica nei prematuri può consentire di chiarire il normale sviluppo vascolare, la perdita di vasi, i meccanismi riparativi e la neovascolarizzazione tipici delle retinopatie proliferative. Fra l'altro, la ROP si sviluppa in un arco di tempo molto più breve (10-20 settimane) rispetto alle retinopatie dell'adulto.

Come sopra ricordato, il ruolo dell'ossigeno come fattore eziologico nella comparsa della ROP fu suggerito da Campbell nel 1951<sup>3</sup>. Ashton per primo propose il concetto di ROP come una sequenza di eventi che cominciano con vasocostrizione a causa di un aumento all'esposizione di ossigeno della retina con conseguente vasoo-

bliterazione e non-perfusione. Egli formulò una teoria secondo la quale le vasoproliferazioni susseguenti avvengono come risposta ad un fattore angiogenetico che scaturisce dalla retina ipossica<sup>20-22</sup>. All'epoca erano disponibili pochissime evidenze a sostegno di tale ipotesi. Mentre il meccanismo della vasocostrizione era fondato sull'osservazione, il resto della sequenza teorica era privo di appoggio diretto. In particolare, la parte che postulava la non-vascularizzazione periferica della retina ischemica nonostante l'alta o normale pressione dell'ossigeno coroideale ed il comportamento delle cellule endoteliali in sviluppo analogo a quello delle cellule attive nella retinopatia diabetica rimase speculativa.

Negli anni '80, Kretzer e Hittner proposero modifiche all'ipotesi di Ashton della fisiopatologia della ROP. La loro teoria sosteneva che le cellule fusiformi mesenchimali, derivate dall'arteria ialoidea, invadono lo strato intraretinico delle fibre del nervo ottico per poi migrare con andamento centrifugo nella retina avascolare. Quando queste cellule primitive migrano, esse si differenziano in cellule endoteliali che si avviano allo sviluppo mentre estendono l'area di retina vascularizzata. È questa interfaccia di differenziazione delle cellule affusolate mesenchimali e la nuova vascularizzazione endoteliale (teoria del *wave-front*) che rappresenta la minaccia per l'insorgenza della ROP al verificarsi di un aumento dell'ossigenazione, associata alla generazione di radicali liberi, il tutto accompagnato dalla immaturità dei sistemi antiossidanti della retina del pretermine. Si verifica una perdita di controllo sulla differenziazione, e le cellule mesenchimali danneggiate provocano anomali cambiamenti di direzione della neovascularizzazione rispetto al fisiologico sviluppo vascolare della retina<sup>23-25</sup>.

Kretzer e Hittner studiarono al microscopio elettronico materiale autoptico della retina di bambini prematuri per stimare il danno delle cellule fusiformi mesenchimali dimostrando un aumento della differenza nella giunzione tra cellule affusolate adiacenti in occhi che hanno sviluppato la ROP. Tale differenza fornì una prima indicazione della disfunzione della membrana cellulare. Un aumento quantitativo di tali differenze nelle giunzioni fu interpretato come riflesso di una condizione patologica in grado di apportare stress allo sviluppo del sistema vascolare della retina. Essi dimo-

strarono, inoltre, un aumento del reticolo endoplasmatico rugoso nelle cellule affusolate che presentavano l'aumento di tali differenze di giunzione. Formularono, quindi, una teoria secondo la quale l'aumento del reticolo endoplasmatico rugoso (RER) indicava un aumentato della secrezione cellulare di fattori angiogenetici. Infine, proposero che l'aumento di queste differenze nelle cellule fusiformi e l'aumento del RER limiterebbe la maturazione delle cellule. Questa *down-regulation* sarebbe accompagnata da miofibroblasti che invadono il vitreo, conducendo a contrazione vitreale e provocando la conseguente trazione retinica.

Anche se alcuni scienziati già sottoscrivevano la teoria di Ashton, le nuove idee proposte da Kretzer e Hittner avevano il pregio di godere di forti evidenze e dimostrazioni fisiologiche. In ambo le teorie, Ashton o Kretzer-Hittner, il denominatore comune è la citotossicità dell'ossigeno per mezzo della produzione di radicali liberi e la mancanza, nei più piccoli bambini prematuri, di meccanismi antiossidanti in grado di fronteggiare la patologia. Penn e coll. convalidarono questo concetto di danno indotto dall'ossigeno e di successiva non-perfusione che conducono a neovascolarizzazione retinica patologica<sup>26,27</sup>.

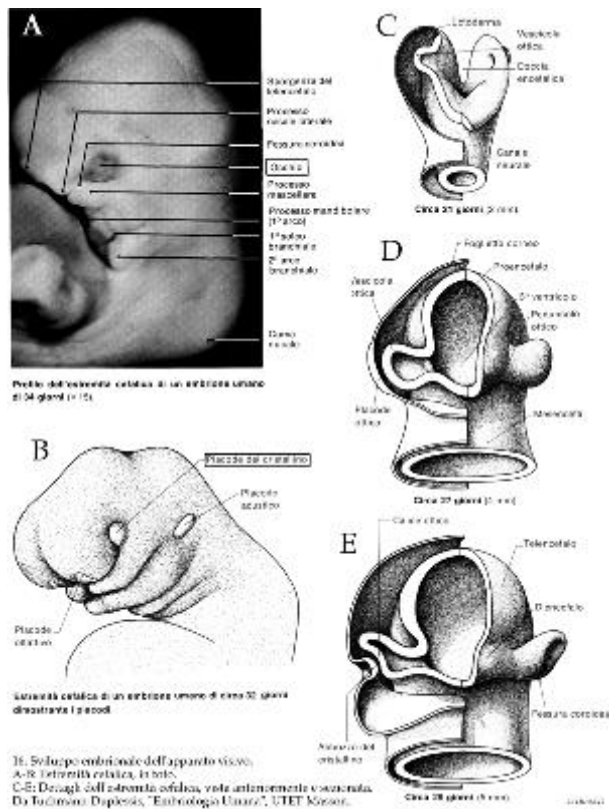
Il processo di neovascolarizzazione della retina fu delucidato ulteriormente con la descrizione di Miller del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) come promotore della neovascolarizzazione oculare<sup>28</sup>. Nel processo di normale vascolarizzazione retinica, esiste un equilibrio delicato tra ipossia e sviluppo della differenziazione e ispessimento della retina fetale che rilasciano il fattore di crescita vascolare endoteliale incentivando la crescita vascolare. Provis et al hanno mostrato istologicamente che l'espressione del VEGF nel normale sviluppo retinico a livello fetale si presenta solo anteriormente al *ridge* (la cresta che, nelle forme "classiche" di ROP, demarca la retina posteriore vascolarizzata da quella anteriore avascolare) nei vasi della retina in sviluppo<sup>29</sup>.

Nella retina di un bambino prematuro, anche se la differenziazione della retina periferica continua (e con essa aumenta il fabbisogno metabolico), la vascolarizzazione retinica può fermarsi o venire deviata da stress ossidativi e da altri danni alle cellule precursori dello sviluppo vascolare. Come è stato meglio delucidato successiva-

mente e vedremo più sotto, tale dilazione, guidata dall'ipossia (con conseguente eccessiva produzione di VEGF, che parrebbe anche concentrarsi nell'area di demarcazione tra la retina vascolarizzata e quella avascolare) promuove il processo neovascolare della ROP.

## 2 – Anatomia embrio-fetale e neonatale

Lo sviluppo dell'occhio (*Figg. 2.1, 2.2*) richiede l'intervento di due dei tre foglietti embrionali: l'ectoderma ed il mesoderma. Intorno al 18° giorno (*Fig. 2.1.c*), sulla parete neuroectodermica del futuro proencefalo, prima della chiusura completa



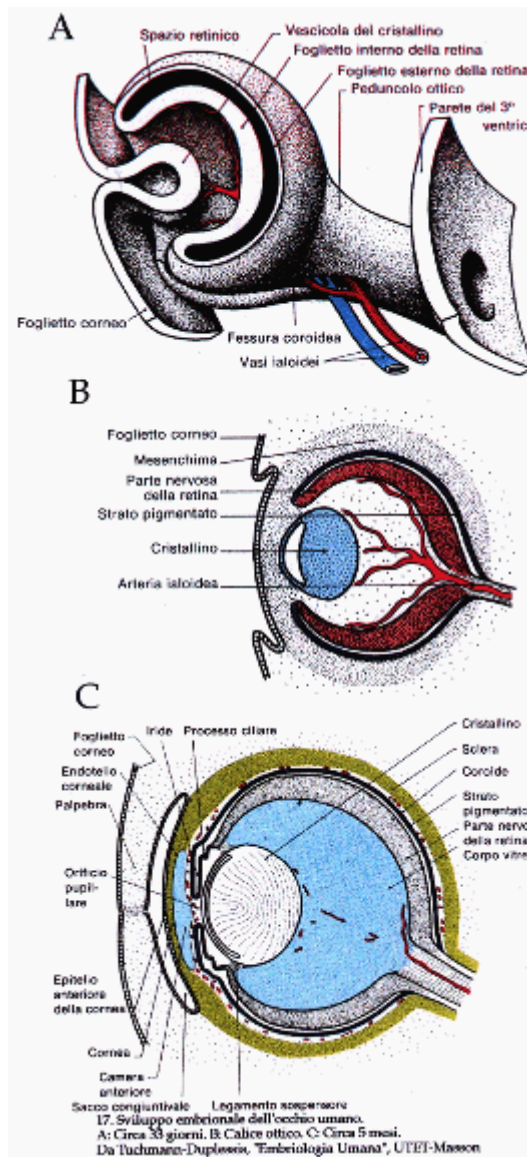
*Fig. 2.1: embriogenesi dell'occhio*

nica col 3° ventricolo tramite il peduncolo. Questo spazio, virtuale nell'adulto, spiega la possibilità del distacco della retina.

Nello stesso periodo in cui si forma la vescicola ottica primaria, si forma anche, davanti ad essa, un ispessimento del foglietto corneo (anch'esso di derivazione ectodermica e che darà origine al tegumento), il placode ottico (*Figg. 2.1.a,b,d*). Rapidamente questa placca si deprime per originare una vescicola (*2.2.a*) che si isola dal foglietto corneo, distaccandosene e rimanendo costituita da un solo strato di cellule.

della doccia encefalica, compare una evaginazione laterale: la vescicola ottica primaria, collegata col diencefalo tramite un peduncolo, il peduncolo ottico. La vescicola si accresce e si invagina, formando così il calice ottico, o vescicola ottica secondaria (Figg. 2.1.e, 2.2.c). Essendo costituito dalla invaginazione su se stessa della parete neuroectodermica, il calice ottico è costituito da due foglietti: interno ed esterno. L'invaginazione interessa anche il peduncolo, determinandovi la fessura coroidea, attraverso la quale l'arteria ialoidea penetra nel peduncolo. A livello del calice ottico, fra i due foglietti resta uno spazio, detto retinico, che comu-

Verso il 40° giorno, le cellule della parete posteriore della vescicola si moltiplicano ed emettono fibre verso le cellule della parete anteriore, colonizzando la cavità della vescicola stessa, dal dietro verso l'avanti (*Fig. 2.2.b*). Le fibre più centrali, le più precoci, formano il nucleo del cristallino e diventano molto presto trasparenti grazie alla comparsa di proteine particolari. La crescita del cristallino, per aggiunta di nuove fibre alla periferia del nucleo, continuerà fino all'età di 20 anni. Nello stesso periodo in



*Fig. 2.2: embriogenesi dell'occhio*

cui il cristallino comincia ad abbozzarsi, compaiono, a spese del materiale mesodermico che circondava la vescicola ottica secondaria, gli abbozzi di quelle che saranno le due tuniche esterne dell'occhio. Di queste, la coroide è analoga alla pia madre, mentre la sclera è analoga alla dura madre. Nello spazio interposto tra abbozzo vescicolare del cristallino e vescicola ottica secondaria, il suddetto materiale mesodermico partecipa attivamente alla formazione del corpo vitreo primario. Nel frattempo, il foglietto esterno del calice resta semplice, ed origina lo strato pigmentato della retina, per la comparsa di granuli di pigmento in seno alle cellule epiteliali. Il foglietto interno, invece, dà origine allo strato nervoso della retina: si ispessisce e si differenzia in più strati cellulari, come le pareti delle vescicole cerebrali, che daranno origine al tessuto cerebrale. Questa dif-



ferenziazione termine al 7° mese: da allora l'occhio è sensibile alla luce, anche se la fovea si differenzierà completamente solo 4 mesi dopo la nascita. Verso la 7a settimana, il peduncolo ottico si chiude, inglobando l'arteria ialoidea ed una parte di mesenchima, che verrà colonizzato dagli assoni delle cellule gangliari costituendo, così, il nervo ottico. Gli assoni procedono poi verso il diencefalo e, arrivati nel suo pavimento, subiscono una decussazione parziale che formerà il chiasma ottico, da dove le fibre raggiungeranno i loro bersagli sottocorticali. Nella sua evoluzione, intanto, il calice ottico tende a chiudersi anteriormente, al davanti del cristallino, delimitando un orifizio, che resterà come pupilla. A questo livello, i foglietti interno ed esterno della retina si riuniscono: il primo, che resta sottile e non subisce qui differenziazioni sensoriali, originerà lo strato interno dell'iride; il secondo darà origine all'epitelio pigmentato dell'iride. Dietro l'iride, i due foglietti retinici accollati presentano qualche plica sollevata dal mesenchima: i processi ciliari. Fra le pieghe ciliari ed il cristallino sono presenti alcune fibre lasse che si trasformeranno nel delicato legamento sospenditore del cristallino. A spese del tessuto mesenchimale che avvolge il primitivo abbozzo dell'occhio vengono quindi a formarsi la coroide, l'iride ed il corpo ciliare. Questa tonaca vascolare, cui arriva sangue tramite l'arteria ialoidea, avvolge completamente il cristallino. In seguito, tale rivestimento scompare lentamente e, al posto dell'arteria ialoidea, permane il canale ialoideo. La porzione più esterna del tessuto mesodermico costituisce la sclerotica. Successivamente, tutto il bulbo oculare, infossandosi progressivamente nella cavità orbitaria, viene a formare un solco circolare che darà origine al fornice congiuntivale. Tale solco, approfondendosi sempre più, determina la formazione delle due pliche cutanee che formeranno le palpebre.

#### **SVILUPPO EMBRIO-FETALE DELLA VASCOLARIZZAZIONE RETINICA**

Il primo evento evidenziabile nel processo di vascolarizzazione retinica, che si verifica intorno alla 15a settimana di gestazione, è rappresentato dalla migrazione di un gran numero di precursori cellulari fusiformi a partenza dal disco ottico (*Fig. 2.3*). Tali elementi cellulari proliferano e si differenziano a formare cordoni di cellule en-

doteliali vascolari. Alla 15a settimana, in realtà, alcuni di tali cordoni sono già internamente cavi e formano un albero vascolare immaturo negli strati retinici interni, centrato sul disco ottico. Tali processi corrispondono a fenomeni di formazione vascolare verificantisi per vasculogenesi. Successivamente, fenomeni angiogenetici provvedono ad incrementare la densità vascolare di tale plesso immaturo, estendendolo perifericamente e temporalmente. La maturazione del plesso è caratterizzata da un profondo rimaneggiamento, che coinvolge le cellule endoteliali, incorporandole in segmenti vascolari adiacenti. Il plesso esterno si forma in seguito all'estensione di gemmazioni capillari a partenza dai vasi interni già formati, in un processo che inizia intorno alla fovea in differenziazione fra la 25a e la 26a settimana.

Pertanto, la formazione dei vasi primordiali della retina centrale è mediata dalla *vasculogenesi* (v. oltre, *Fisiopatologia*), mentre *l'angiogenesi* è responsabile dell'incremento di densità vascolare e della vascolarizzazione periferica della retina interna. Per converso, il plesso vascolare esterno ed i capillari radiali peripapillari vengono formati solo per angiogenesi. Tali meccanismi, per inciso, appaiono simili a quelli responsabili della vascolarizzazione del sistema nervoso centrale embrio-fetale<sup>30-33</sup>.

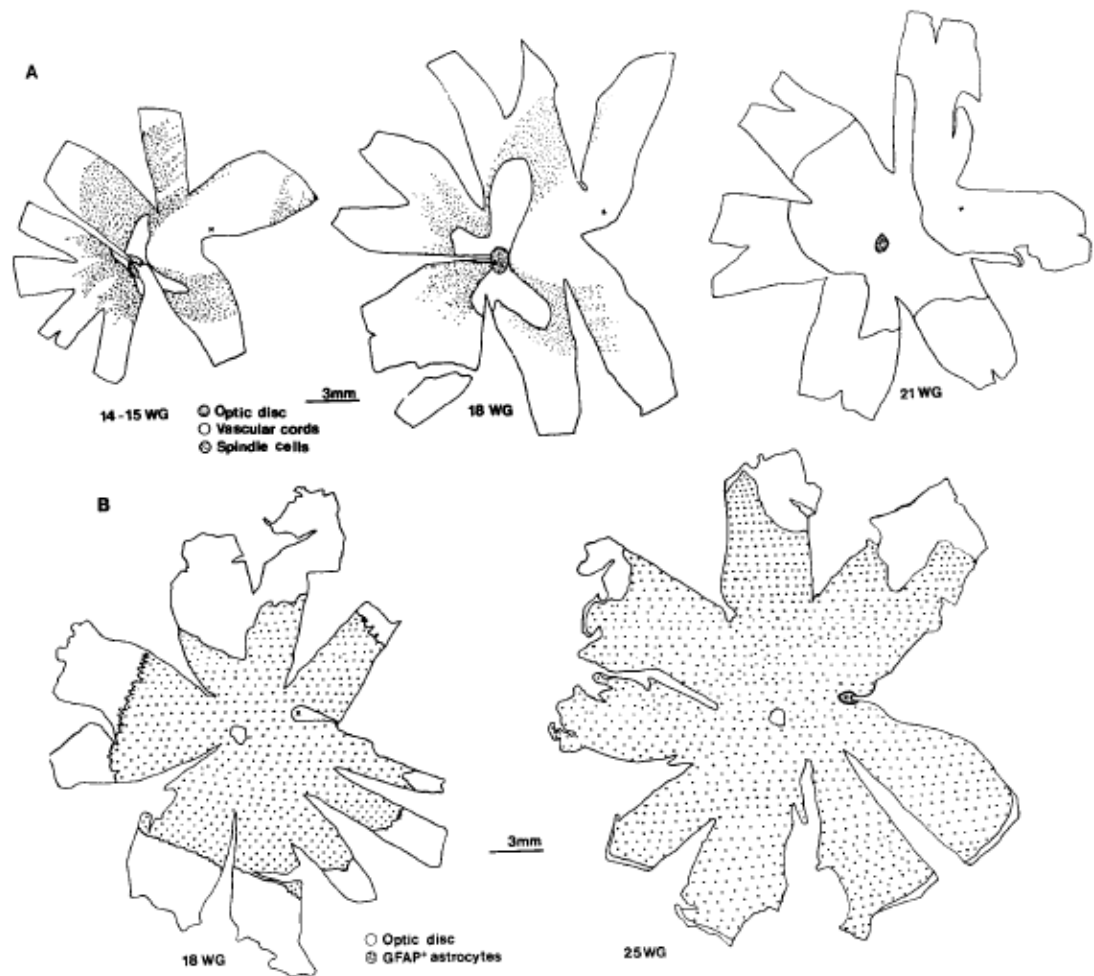
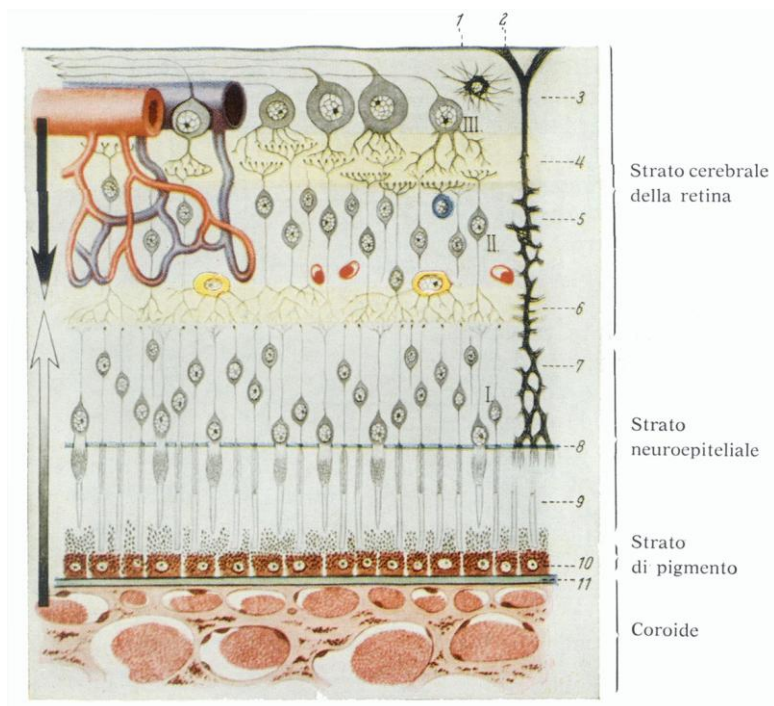
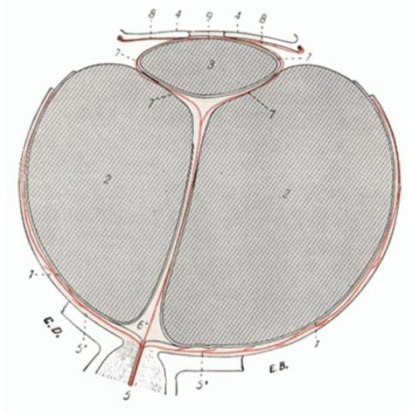


Fig. 2.3: Mappe topografiche di cellule fusiformi e cordoni vascolari nella retina umana a 14, 15, 18 e 21 settimane. (da Hughes et al, IOVS 2000)

Il circolo retinico a termine (Figg. 2.4.a,b) è costituito da arterie che si dividono dicotomicamente a partire dalla papilla ottica, a livello della quale emerge l'arteria centrale della retina che ha percorso l'ultimo tratto del suo decorso penetrando all'interno del nervo ottico. I rami arteriosi, via via più sottili, raggiungono l'estrema periferia retinica. Le vene retiniche percorrono a ritroso lo stesso percorso in numero di una per ciascun ramo arterioso per andare a formare la vena centrale della retina. Essa lascerà l'occhio mantenendosi per breve tratto all'interno dello stesso nervo ottico. Si tratta di un circolo terminale del tutto analogo al circolo encefalico, e pertanto non esistono anastomosi fra vasi.



*Fig. 2.4.a: Rappresentazione schematica della retina (sezione). In alto, rami dell'a. e della v. centrali retiniche*

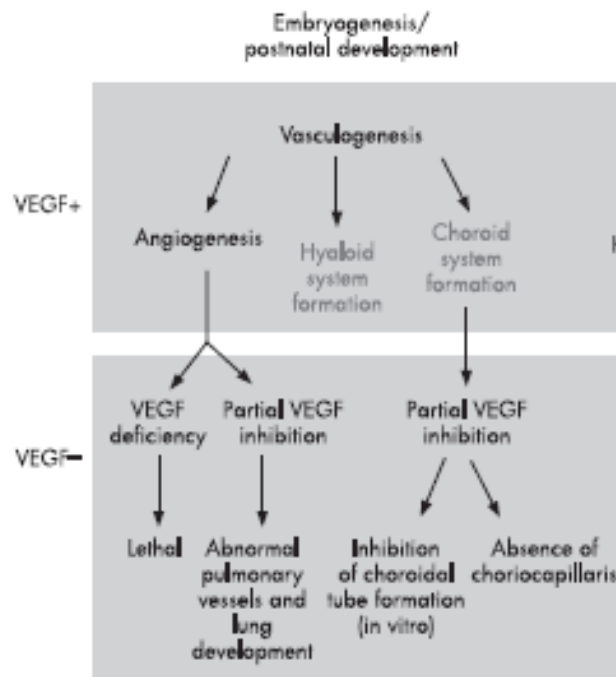


*Fig. 2.4.b: Nel disegno, l'a. ialoidea, ramo dell'a. centrale retinica, con propri rami della lente (tunica vasculosa lentis), destinata ad obliterarsi intorno alla 36° sett. EG.*

## 3 – Fisiopatologia

---

Come anticipato nella sezione dedicata allo sviluppo embrio-fetale della retina umana, la formazione dei vasi primordiali della retina centrale è mediata dalla *vasculogenesis* (fenomeno probabilmente VEGF-indipendente), mentre *l'angiogenesis* (fenomeno sicuramente VEGF-dipendente) è responsabile dell'incremento di densità vascolare e della vascolarizzazione periferica della retina interna (*Fig. 3.1*). Per converso, il plesso vascolare esterno ed i capillari radiali peripapillari vengono formati solo per angiogenesis. Tali meccanismi, per inciso, appaiono simili a quelli responsabili della vascolarizzazione del sistema nervoso centrale embrio-fetale<sup>30-33</sup>.



*Fig. 3.1: Ruolo del VEGF nella vasculogenesis e nell'angiogenesis embrio-fetale e postnatale (da Bhisitkul RB, BJO 2006, modificato)*

## FISIOPATOLOGIA DELLA RETINOPATIA DEL PRETERMINE

La ROP è stata, negli ultimi anni, al centro di una progressiva comprensione della neovascolarizzazione, in gran parte dovuta allo sviluppo indipendente del mo-

dello OIR (*oxygen-induced retinopathy*) da parte di Lois Smith e Tailoi Chan-Ling<sup>34-39</sup> (*Fig. 3.2*).

IGF-1, fattore pro-angiogenetico, è reso disponibile in utero, per il feto, dalla placenta e dal liquido amniotico ed è indispensabile per la fisiologica maturazione dei vasi retinici, oltre a giocare un importante ruolo nel potenziare l'azione del VEGF.

Altri fattori pro-angiogenetici sono rilevanti nella fisiopatologica dello sviluppo vascolare retinico, come GH e e-NOS (*endothelial nitric-oxide synthase*), i quali aumentano l'espressione dei recettori per i fattori di crescita delle membrane endoteliali (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) e di conseguenza aumentano la neovascolarizzazione associata a invasione vitreale.

In contrapposizione giocano i fattori antiangiogenetici, che intervengono in seguito al processo sopra indicato: il PEDF (*pigmented epithelium derived factor*), presente nel vitreo insieme a TGF- $\beta$  e angiostatina garantisce lo stato avascolare del vitreo; e gli i-NOS (*inducible nitric oxide synthase*), i quali intervengono per diminuire l'espressione dei recettori per il VEGF e la neovascolarizzazione retinica.

Il modello OIR si è rivelato molto istruttivo, avendo consentito di cristallizzare l'ipotesi che la ROP sia causata da un processo di due tappe (o fasi): la fase I, cioè quella della obliterazione vascolare ossigeno-indotta, seguita da una sovra-espressione di citochine vasoattive (fase II), come il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF); tale sovra-espressione è alimentata dall'aumento della richiesta metabolica tissutale retinica, dalla riduzione della supplementazione di ossigeno alla retina e dalla diffusa ischemia tissutale generata dalla iperossia di fase I.

La ROP, come altre patologie oculari caratterizzate da neovascolarizzazione, presenta, in effetti, tali due fasi. La prima fase consiste nella cessazione della crescita vascolare e nella perdita di vasi. Nella ROP, questa fase ha il suo inizio al momento della nascita prematura ed è associata con la perdita di fattori normalmente forniti dalla madre in utero. La fase I viene precipitata dall'addizione di fattori presenti nell'ambiente extrauterino, in specie l'ossigeno, presente in aria ambiente a concentrazioni già superiori a quelle intrauterine; la conseguente iperossia relativa viene ul-

teriormente esacerbata dalla supplementazione terapeutica di ossigeno. Lo sviluppo normale della vascolarizzazione retinica nel feto avviene, infatti, a tensioni di  $O_2$  pari a circa 2-3 kPa. Alla nascita, in assenza di patologia polmonare, si raggiungono livelli circolanti di  $O_2$  dell'ordine di 6-10 kPa. Tale drastica variazione di esposizione ambientale determina sia una cessazione della normale crescita vascolare, sia una obliterazione vascolare, con la conseguenza che la retina periferica rimane avascolare. Tale fenomeno, per inciso, si registra sia nei neonati pretermine che nei neonati a termine.

Durante la fase I, i fattori di crescita regolati dall'ossigeno vengono soppressi dagli alti livelli tissutali di  $O_2$ , mentre gli altri fattori vengono a mancare, in quanto fisiologicamente forniti dalla madre nell'ultimo trimestre della gravidanza. Lo sviluppo post-natale della retina ne determina un aumento dell'attività metabolica, con la conseguenza che la retina avascolare diviene ipossica: ciò determina la fase II della ROP. L'ipossia tissutale di fase II induce un rapido incremento dei fattori di crescita regolati dall'HIF (hypoxia-induced factor), che erano stati soppressi nella fase I. Nel contempo, i fattori materni mancanti possono subire dei modesti incrementi qualora il fegato ed altri organi fetali responsabili della loro produzione siano già sufficientemente sviluppati, ma restano comunque a livelli più bassi che in utero.

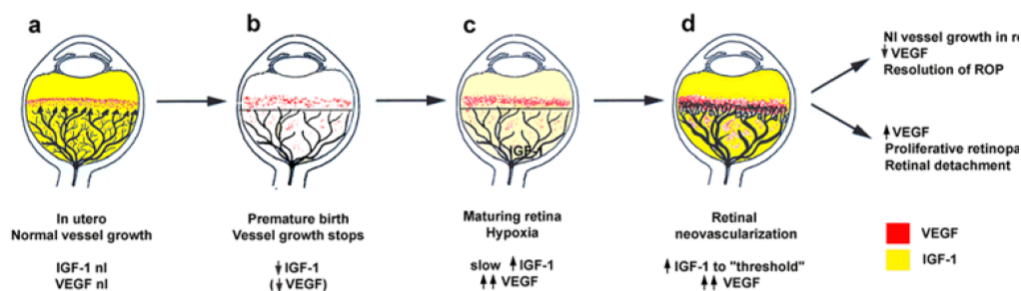


Fig. 3.2: Ruolo dell'IGF-1 e del VEGF nella fase I e II della ROP (modello OIR). Da Smith, *Angiogenesis*, 2007

Per studiare le due fasi Lois Smith et al hanno sviluppato un modello murino di retinopatia ossigeno-indotta, allo scopo di poter sfruttare la manipolazione genetica possibile nel topo; in tale modello, diversamente da altri roditori, può essere indotta, nell'arco di 10 giorni, lo sviluppo affidabile e quantificabile di una forma proliferante di retinopatia<sup>40</sup> (Fig. 3.2). Topi neonati vengono sottoposti ad  $O_2$  al 75% dal 7° al



12° giorno post-natale; l'iperossia causa la regressione vascolare e si verifica la cessazione della normale crescita vascolare radiale centro-periferica analogamente alla fase I della ROP. L'estensione della vaso-obliterazione può essere determinata misurando l'area non perfusa in preparati retinici interi. Riportando la concentrazione di ossigeno ai livelli presenti in aria ambiente, le aree retiniche non perfuse divengono ipossiche, inducendo l'espressione di fattori angiogenici e la conseguente neovascolarizzazione. La fase neovascolare del modello animale è simile alla fase II della ROP umana, oltre a mimare, per inciso, molti aspetti della retinopatia diabetica proliferante e della AMD. I *tufts* (ciuffi) neovascolari possono essere misurati quantificando i nuclei cellulari estendentisi nel vitreo in sezioni trasversali del vitreo, oppure quantificando l'area dei *tufts* in preparati a piatto.

### *Ruolo dei fattori ossigeno-regolati*

---

#### RUOLO DEL VEGF NELLA ROP

L'eccessiva esposizione all'ossigeno è stata associata allo sviluppo della ROP fin dagli anni '40 del secolo scorso, quando la fibroplasia retrolentale venne per la prima volta descritta dopo l'introduzione delle prime incubatrici chiuse, che consentirono di supplementare ossigeno ai neonati in concentrazioni mai raggiunte in precedenza. Nonostante che non fosse chiaro, all'inizio, che tali livelli fossero tossici per la retina neonatale, divenne chiaro, nel tempo, che la perdita di vasi causata dall'iperossia provoca una ipossia retinica, che stimola il rilascio di fattori che influenzano la crescita vascolare. Già Michaelson (<sup>61</sup>) 41 e, come abbiamo detto, Ashton<sup>20,21,22</sup> suggerirono che dei fattori ossigeno-regolati potevano essere coinvolti nella neovascolarizzazione retinica (fase II della retinopatia), ma non ne fu identificato nessuno per decenni. Il VEGF (*vascular endothelial growth factor*) era, per così dire, un buon candidato a rappresentare tale tipo di molecola.

Gli esperimenti che sono risultati decisivi nel disegnare il concetto di fase I e fase II furono condotti separatamente nei laboratori di Eli Keshet<sup>42</sup> e Lois Smith<sup>37,38,43</sup> dal 1994; essi dimostrarono che la tempestiva supplementazione iniettiva di VEGF durante la fase I poteva prevenire la ROP. Tale osservazione conferma il ruolo causativo esercitato dalla iperossia nella *down-regulation* della produzione tonica di fattori di crescita cruciali per lo sviluppo retinico.

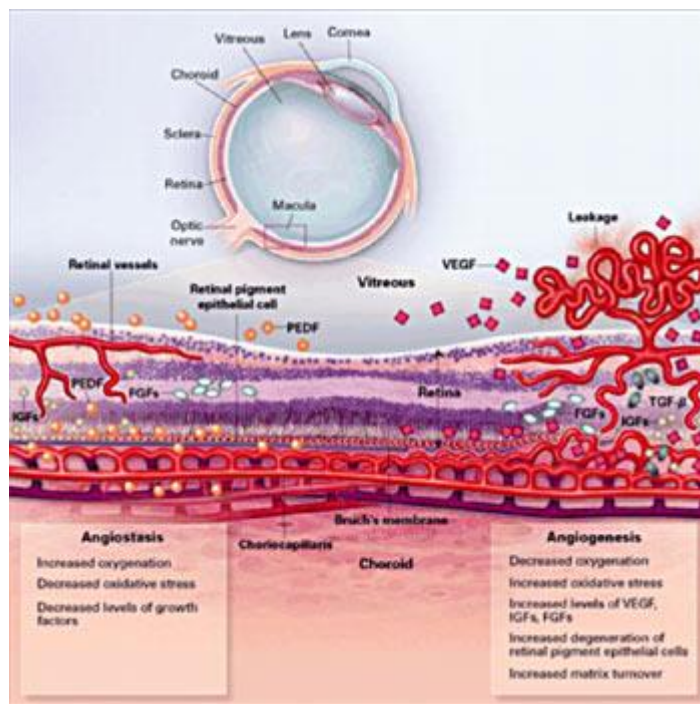
I VEGFs, riconosciuti in precedenza come VPFs (*vascular permeability factors*), costituiscono una famiglia i cui componenti sono designati come VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e fattori di crescita placentari (PlGF).

I membri della famiglia VEGF hanno funzioni distinte: promuovono la *vasculogenesi*, cioè la costituzione, durante lo sviluppo embrionale, di una rete vascolare primitiva e hanno un ruolo centrale nella crescita di nuovi vasi, l'*angiogenesi*.

Il VEGF-C induce specificatamente la proliferazione dell'endotelio linfatico e l'iperplasia dei vasi linfatici.

Il VEGF era stato inizialmente identificato e descritto come VPF e solo più tardi ne fu chiarita la funzione di stimolo alla proliferazione delle cellule endoteliali. Il VEGF è regolato dall'ossigeno, in particolare dagli incrementi di HIF e mRNA del VEGF in risposta all'ipossia e gioca un ruolo fondamentale nell'angiogenesi tumorale. Per tale ragione, l'attenzione dei ricercatori si è concentrata sul VEGF come uno dei possibili fattori che, secondo Michaelson<sup>41</sup>, potevano avere parte nel determinismo della fase II della ROP, oltre che della perdita vascolare della fase I.

Sulla base di questi e di altri studi, il trattamento anti-VEGF per via intravitreale è oggi disponibile per la AMD ed in trial per la retinopatia diabetica.



*Fig. 3.3: Rappresentazione schematica dei fattori angiostatici e proangiogenici (v. testo)*

### INCREMENTO DEL VEGF NELLA FASE II DELLA ROP

Nel modello murino di retinopatia precedentemente descritto è stata esaminata l'espressione di mRNA per il VEGF dopo perdita vascolare ossigeno-indotta (gg. postnatali 7-12) e l'ipossia conseguente iniziata al g. 12. L'espressione di VEGF aumenta nelle cellule di Müller e negli astrociti della retina esterna, con corrispondenza temporale rispetto all'inizio della neovascolarizzazione patologica. Una osservazione ancora più decisiva è derivata dalla inibizione di VEGF dopo iniezione intravitreale o di un oligonucleotide antisense anti-VEGF o di una molecola legante il VEGF (chimera recettore VEGF-IgG), entrambi risultate in grado di ridurre significativamente la risposta neovascolare di fase II, indicando pertanto che il VEGF è un fattore critico nella neovascolarizzazione retinica. Anche alcuni studi basati su un modello di scimmia di occlusione venosa di branca in grado di indurre neovascolarizzazione iridea hanno contribuito a sostenere l'ipotesi del ruolo centrale del VEGF nella neovascolarizzazione oculare. In campioni retinici tratti da un paziente affetto da ROP, il pattern di espressione del VEGF è stato trovato simile a quello del modello murino di ROP.

### SOPPRESSIONE DEL VEGF NELLA FASE I DELLA ROP

Il VEGF è essenziale anche per lo sviluppo della vascolarizzazione retinica e nella fase I della ROP. Durante il normale sviluppo retinico, i vasi crescono dalla papilla ottica verso la periferia. Dato che la neuroretina si sviluppa anteriormente al fronte d'onda dell'albero vascolare, la crescente richiesta metabolica di tale tessuto in evoluzione genera un gradiente ipossico tissutale fisiologico che precede la crescita vascolare. In risposta all'ipossia, l'espressione astrocitaria di VEGF stimola la crescita vascolare, che segue il *template* originato dagli astrociti. Via via che si formano nuovi vasi e diminuisce l'ipossia tissutale, l'espressione di VEGF e l'ulteriore crescita vascolare vengono progressivamente inibiti da un meccanismo di feedback locale.

Tuttavia, l'ossigeno supplementato ai neonati pretermine interferisce con il normale sviluppo vascolare guidato dal VEGF. Nella fase I del modello murino di ROP l'iperossia sopprime l'espressione di VEGF, con la conseguente abolizione del fisiologico gradiente ipossico anteriore al fronte vascolare in crescita; ne derivano sia la cessazione della normale crescita vascolare, sia la regressione dei vasi esistenti. L'iperossia crea aree patologicamente ampie di retina avascolare che giungono alla fase II fornendo un abbondante substrato per la neoangiogenesi patologica, quale la retina avascolare che secerne eccessive quantità di VEGF. La vaso-obliterazione indotta dall'iperossia è causata dall'apoptosi delle cellule endoteliali vascolari e può essere parzialmente prevenuta attraverso la somministrazione di VEGF esogeno o di PlGF-1, un ligando specifico del VEGFR-1. Tale reperto indica che il segnale per il VEGF VEGFR-1-mediato è necessario per la sopravvivenza della vascolarizzazione retinica immatura e spiega – almeno in parte – l'effetto dell'iperossia sul normale sviluppo vascolare nella ROP.

### NEUROPROTEZIONE FORNITA DAL VEGF

Nel modello murino di ROP i neuroni retinici hanno dimostrato di richiedere VEGF. Il VEGF è stato normalmente descritto come un mitogeno specifico per le cel-

lule endoteliali; a loro volta, anche i VEGFR-1 e -2 sono stati descritti come endotelio-specifici; tuttavia, l'occhio in fase di sviluppo ha fornito una opportunità peculiare per studiare la funzione del VEGF nel tessuto nervoso. La retina periferica è normalmente avascolare alla nascita e diviene vascolarizzata nelle due settimane post-natali. Tale tessuto avascolare può essere valutato mediante il blocco del VEGF, senza le possibili interferenze nel determinismo di altre patologie potenzialmente generate dall'inibizione vascolare. Sia l'MRNA che la proteina corrispondenti a VEGFR-1 e -2 sono stati trovati nel tessuto neurale extravascolare durante le prime fasi dello sviluppo retinico. Anche la cornea vascolarizzata esprime tali recettori. L'inibizione di VEGFR-1 e -2 in vivo ottenuta mediante SU5416, un antagonista specifico della tirosino-kinasi a basso peso molecolare è risultata in grado di determinare l'inibizione dello sviluppo della retina immatura avascolare, con conseguente perdita cellulare della retina interna, compresi lo strato nucleare interno, che contiene le cellule di Müller e lo strato delle cellule ganglionari, che contiene gli astrociti. VEGFR-1 e -2 sono risultati necessari per il normale sviluppo retinico, indipendentemente dallo sviluppo vascolare.

La soppressione del VEGF nella fase proliferante della retinopatia è oggi il primo presidio medico per tale patologia ed ha modificato profondamente il modo di trattare la AMD. Lo studio della ROP, tuttavia, oltre a meglio definire come l'inibizione del VEGF possa sopprimere la malattia proliferante nella AMD e nella retinopatia diabetica (oltre che nella ROP), ha altresì suggerito l'importanza del VEGF nella sopravvivenza sia vascolare che neurale. Gli studi sulla ROP hanno dimostrato che il timing e il grado di soppressione del VEGF sono critici; un eccesso di soppressione potrebbe condurre ad un peggioramento della patologia.

Un ulteriore studio di Chen et al ha dimostrato l'effetto di altri fattori di crescita (quali, ad esempio, l'eritropoietina – EPO) nel modello OIR<sup>43</sup>. Tali studi hanno un denominatore comune: tutti dimostrano, infatti, che il timing della somministrazione del fattore di crescita è decisivo nel determinarne l'utilità o il potenziale dannoso. Molecole proangiogeniche come il VEGF, la EPO ed altri fattori di crescita coinvolti nella cascata angiogenica prevengono la ROP se somministrati in fase I; al contrario,

la esacerbano se utilizzati in fase II. Ciò suggerisce, evidentemente, che la terapia anti-VEGF dovrebbe essere impiegata nella fase II della ROP umana.

Gli esperimenti citati dimostrano altresì che i livelli dei fattori di crescita sono suscettibili di una fine regolazione attraverso la modulazione della molecola che ne stimola o inibisce, rispettivamente, la produzione: l'ossigeno. Un articolo decisivo di Chow et al ed uno studio di follow-up di Wright et al hanno confermato la necessità di una rivalutazione dei nostri attuali standard di supplementazione dell'ossigeno<sup>44,45</sup>. Tali studi riportano dati secondo i quali l'incidenza di ROP soglia può essere ridotta mantenendo bassi livelli di saturazione dell'O<sub>2</sub> in neonati sotto le 32 settimane di EG corretta e livelli maggiori nei neonati di età superiore. Flynn et al hanno inoltre suggerito che il mantenere nati pretermine al 100% di saturazione non è fisiologico e rappresenta un fattore irritativo, dato che in utero il feto non supera l'80% di saturazione<sup>46</sup>.

### *Ruolo dei fattori non-ossigeno-regolati*

---

#### RUOLO DEL GH E DELL'IGF-1 NELLA PATOGENESI DELLA ROP

L'ossigeno, in parte agendo attraverso il VEGF, gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo vascolare retinico e nella ROP. Tuttavia, occorre tener presente che altri mediatori biochimici sono coinvolti nella patogenesi della ROP. L'inibizione del VEGF non inibisce completamente la neovascolarizzazione patologica ipossia-indotta della fase II. Pur potendo l'ossigeno da solo provocare la cessazione della crescita vascolare e la vaso-obliterazione nella fase I della malattia sperimentale murina, risulta evidente che la ROP clinica è multifattoriale; infatti, pur con un impiego controllato della supplementazione di ossigeno, la malattia persiste, suggerendo quindi che altri fattori collegati alla prematurità siano in gioco.

Il fatto stesso che la prematurità sia il principale fattore di rischio per la ROP suggerisce un ruolo-chiave dei mediatori coinvolti nella crescita e nello sviluppo.

L'ormone della crescita (GH, *growth hormone*) e l'*insulin-like growth factor* (IGF-1), mediatore di molte delle attività mitogene del GH, sono stati studiati come fattori non-ossigeno-regolati. Si è iniziato a sospettare il loro ruolo successivamente alla scoperta che l'ablazione dell'ipofisi esercita un effetto benefico sulla progressione della retinopatia diabetica. Il modello murino sopra ricordato ha consentito anche di chiarire che l'IGF-1 è fattore critico in ambedue le fasi della ROP, fatto, questo, supportato anche dall'evidenza clinica.

### RUOLO DELL'IGF-1 NELLA FASE I DELLA ROP

L'IGF-1 gioca un ruolo critico nella fase I della ROP e nello sviluppo retinico fisiologico. Gli IGFs (1 e 2) sono importanti per la crescita e per lo sviluppo fetale in tutte le fasi della gravidanza. La concentrazione serica di IGF-1 (ma non quella di IGF-2) aumenta con l'EG e correla con le dimensioni fetali. I livelli di IGF-1 salgono in modo significativo nel terzo trimestre, ma crollano dopo il parto, in conseguenza della perdita di IGF-1 fornito dalla placenta e dal liquido amniotico. E' stato ipotizzato da Smith e Shen che tale fenomeno sia associato con la cessazione della crescita vascolare e con la conseguente genesi della ROP proliferante<sup>47</sup>. Studi su modelli animali hanno dimostrato che vasi retinici normali crescono più lentamente in topi *knockout* rispetto a topi *wild type*, secondo un pattern molto simile a quello riscontrabile in neonati affetti da ROP. L'IGF-1, inoltre, controlla l'attivazione VEGF-mediata della *pathway* di sopravvivenza cellulare endoteliale Akt. Tali riscontri sostengono l'ipotesi che la perdita di espressione di IGF-1 possa causare la ROP impedendo la normale sopravvivenza cellulare endoteliale.

Il ruolo dell'IGF nella fase I della ROP è sostenuto anche dall'osservazione clinica. I livelli serici medi di IGF-1 in neonati accoppiati per età correlano direttamente con la gravità clinica della ROP. L'IGF-1 appare essere un fattore di rischio per la ROP determinante quanto l'EG ed il peso alla nascita. Bassi livelli di IGF-1 in neonati pretermine correlano anche con lo sviluppo cerebrale e possono essere parte in causa nella genesi di alcune disfunzioni retiniche dei prematuri che non sviluppano ROP.

In pazienti con deficit dell'asse GH/IGF-1, livelli molto ridotti di IGF-1 causano direttamente una diminuzione della densità vascolare retinica.

Tali evidenze suggeriscono che bassi livelli di IGF-1 durante lo sviluppo sono associati con perdita vascolare e possono contribuire alla degenerazione vascolare precoce della fase I, che rappresenta il punto di partenza per la retinopatia proliferante indotta dall'ipossia nel modello OIR. Nel loro insieme, questi risultati generano la possibilità che una tempestiva supplementazione di IGF-1 in grado di riportarne i livelli a valori simili a quelli disponibili per il feto in utero possa prevenire la ROP in quanto permetterebbero di promuovere lo sviluppo vascolare fisiologico. Dato che esso previene la genesi della ROP, l'entità e l'estensione dei successivi trattamenti destruenti retino-ablativi è predeterminata dalla fase I; prevenire la perdita vascolare di fase I può impedire la neovascolarizzazione di fase II. Sono attualmente in corso di definizione alcuni trials clinici per la supplementazione in neonati pretermine di IGF-1 e IGFBP-3 (*IGF-binding protein 3*) a livelli intrauterini al fine di valutare se ciò sia in grado di ridurre la gravità della ROP.

### RUOLO DELL'IGF-1 NELLA FASE II DELLA ROP

Il primo studio che dimostrò l'importanza dell'IGF-1 nelle retinopatie fu il già citato lavoro sulla fase II della ROP<sup>43</sup>. In tale fase, la neovascolarizzazione retinica risulta significativamente ridotta sia in topi transgenici che esprimono un antagonista per il recettore del GH, sia in topi normali supplementari con un analogo della somatostatina in grado di ridurre il rilascio di GH. L'inibizione della vascolarizzazione da parte del GH carente è mediata dall'inibizione dell'IGF-1, dato che la supplementazione sistemica di IGF-1 è in grado di ripristinare una normale crescita vascolare nei topi normali trattati con somatostatina. La prova diretta del ruolo dell'IGF-1 nella fase proliferante della ROP è venuta dall'impiego di un antagonista del recettore per l'IGF-1, in grado di sopprimere la neovascolarizzazione retinica senza alterare i livelli patologici di VEGF indotti nel modello di ROP murina.



Altri studi hanno valutato il ruolo di IGF-1 ed insulina nel modello di ROP murina in topi knockout sia per lo specifico recettore endoteliale vascolare per l'IGF-1 che per quello per l'insulina. Entrambi i tipi di topi transgenici hanno mostrato una decisa riduzione della neovascolarizzazione retinica rispetto ai controlli. Nei topi knockout per il recettore per l'insulina, la riduzione della neovascolarizzazione è risultata associata ad una riduzione dell'espressione di VEGF<sup>48</sup>. Tali reperti suggeriscono che sia il segnale insulino-mediato che quello IGF-1-mediato possono essere implicati nella regolazione della neovascolarizzazione retinica.

### *Interazioni tra VEGF e IGF-1 nell'evoluzione della ROP*

---

In condizioni di inibizione sia del GH che dell'IGF-1 nella ROP di fase II, la produzione di VEGF indotta dall'ipossia rimane invariata, indicando che in tali condizioni sperimentali l'IGF-1 non agisce direttamente attraverso il VEGF. E' stato suggerito che l'IGF-1 possa regolare la neovascolarizzazione retinica almeno in parte attraverso il controllo dell'attivazione da parte del VEGF della proteina di segnale p44/42 MAPK, stabilendo pertanto l'esistenza di una relazione gerarchica tra recettori per l'IGF-1 e per il VEGF<sup>49</sup>. L'IGF-1 avrebbe un ruolo permissivo nei confronti della massima stimolazione vascolare VEGF-mediata. Riducendo i livelli di IGF-1 si inibisce la crescita vascolare nonostante la presenza di VEGF. Questi studi suggeriscono, appunto, che l'IGF-1 riveste un ruolo permissivo e che il VEGF da solo non sia sufficiente a promuovere una evidente angiogenesi retinica.

Sulla base della comprensione dei ruoli del VEGF e dell'IGF-1 in entrambi le fasi della malattia, è stato possibile definire un possibile razionale per l'evoluzione della ROP (Figg. 3.3, 3.4). Lo sviluppo vascolare retinico richiede sia IGF-1 che VEGF. Nei nati pretermine l'IGF-1, normalmente fornito dalla placenta e dal liquido amniotico con la nascita crolla a concentrazioni molto basse, data l'incapacità del fegato prematuro di rimpiazzare la perdita. La crescita vascolare, pertanto, rallenta o si arresta, dato che l'IGF-1 è essenziale per permettere il *signaling* VEGF-mediato per la crescita e per la sopravvivenza endoteliale vascolare. Quando l' O<sub>2</sub> viene sup-

plementato al neonato pretermine, anche l'espressione di VEGF viene soppressa. Pertanto, sia la prematurità che l'O<sub>2</sub> contribuiscono alla soppressione della normale crescita vascolare ed alla perdita vascolare della fase I della ROP. In seguito all'accrescimento del neonato ed all'aumento delle richieste metaboliche della retina in maturazione (richieste non soddisfatte da un adeguato apporto di ossigeno ematico in conseguenza della perdita vascolare retinica), la retina stessa diviene ipossica ed induce una aumentata espressione di VEGF. Nel frattempo, essendo progredita la maturazione anche degli altri organi ed apparati – fegato compreso -, i livelli di IGF-1 salgono, permettendo improvvisamente al VEGF presente a livelli patologicamente elevati, di stimolare la crescita vascolare retinica. Il risultato di ciò è l'avvio e lo sviluppo della fase II della ROP caratterizzata dalle anomalie di proliferazione neovascolare tipiche delle sue diverse forme cliniche.

### *Ruolo delle cellule gliali*

---

Come anticipato, risulta oggi chiaro che il modello OIR non rappresenta una patologia meramente caratterizzata da un'aberrante crescita vascolare retinica.

Lo sviluppo vascolare patologico extra-retinico (intravitreale) avviene a spese di quello fisiologico che dovrebbe condurre alla crescita di vasi negli strati profondi della retina; ciò determina la condizione di retina periferica avascolare.

In aggiunta a tale fenomeno, si assiste, nel modello OIR, ad una significativa perdita neuronale, in particolare a carico dei circuiti neurali deputati alla visione alle basse luminanze. Tale fenomeno viene attribuito alla mancanza di vasi sanguigni, a sua volta derivante dagli anomali livelli di VEGF biodisponibile a livello intraretinico.

E' probabile che uno degli elementi-chiave per la comprensione della crescita vascolare aberrante e della disfunzione neuronale nel modello OIR risieda nei cambiamenti che si verificano a carico delle cellule gliali retiniche. Queste, che comprendono astrociti e cellule di Müller, rappresentano elementi di supporto cruciali sia per

lo sviluppo che per il mantenimento della vascolarizzazione. Una perdita rilevante di astrociti è stata osservata nel modello OIR murino e ad essa consegue una angiogenesi patologica, causata dalla perdita del *template* gliale. E' stato anche dimostrato che la somministrazione di un antagonista del recettore per l'angiotensina 1 (valsartan) è in grado di impedire la morte degli astrociti e di promuovere una normale crescita vascolare negli strati retinici profondi.

### **CENNI SULLE INFLUENZE GENETICHE NELLA ROP**

Uno degli elementi pressoché tipici della ROP è la frequente asimmetria di interessamento di un occhio confronto all'altro; questa disparità di sofferenza in una condizione che si ritiene dovuta a fattori dello stesso tipo e della stessa intensità in ambedue gli occhi, fa pensare che siano in gioco altri elementi, oltre a quelli già elencati.

Nell'ipotesi che i fattori genetici possano avere un ruolo nel predisporre i neonati allo sviluppo della ROP, è stato intrapreso uno studio per analizzare la ROP nei gemelli pretermine monozigoti e dizigoti al fine di determinare e valutare l'entità della suscettibilità genetica<sup>50</sup>.

Lo studio, di tipo retrospettivo (1994-2004), è stato condotto in tre centri (di cui due negli Stati Uniti e uno in Svezia), presso i quali sono stati raccolti i dati dei nati gemelli prima della 32a settimana di gestazione, che siano sopravvissuti oltre la 36° settimana di vita postmestruale.

Sono state così raccolte 63 coppie di gemelli monozigoti e 137 coppie di gemelli dizigoti. Sono stati esaminati: l'età gestazionale, il peso alla nascita, il sesso, la sindrome da difficoltà respiratoria, la retinopatia del prematuro, la displasia broncopulmonare, la durata della ventilazione, l'uso della supplementazione di ossigeno e la lunghezza della permanenza in ospedale.

La retinopatia del prematuro è stata diagnosticata da oftalmologi e pediatri quando è stata rilevata una proliferazione vascolare incompleta o anormale della retina.

I fattori genetici sono stati riscontrati responsabili del 70,1% della variabilità della retinopatia del prematuro.

### **CENNI SUL RUOLO DEI RADICALI LIBERI**

I neonati che sviluppano ROP hanno spesso altre gravi affezioni del pretermine ed un decorso clinico molto più travagliato. Pertanto la patogenesi della malattia riconosce come momento essenziale il verificarsi di più eventi sfavorevoli: prematurità, ossigenoterapia, esposizione alla luce, ripetute trasfusioni, concomitanza d'altre patologie (RDS, BPD, IVH, PDA, sepsi), responsabili di un'aumentata produzione di radicali liberi o di una riduzione delle difese nei loro confronti.

L'azione patogena dei radicali liberi s'identifica con quella delle cosiddette specie tossiche dell'ossigeno e quindi con il danno di natura ossidativa, oggi noto anche sotto la denominazione di stress ossidativo. La nascita di per sé comporta un importante stress ossidativo per il repentino passaggio dall'ambiente intrauterino, relativamente ipossico ( $pO_2$  20-25 mmHg) e riscaldato, ad un ambiente extrauterino caratterizzato da concentrazioni d'ossigeno, come detto, circa 6-7 volte più elevate.

La tossicità dell'ossigeno deriva dalla possibilità che da esso si generino molecole altamente reattive (anione superossido, perossido di idrogeno, ossigeno singoletto e radicale ossidrilico) le quali, possedendo uno o più elettroni spaiati sull'orbitale esterno, tendono a raggiungere l'equilibrio interagendo con molecole vicine che diventano a loro volta radicali.

Numerosi tentativi a scopo preventivo sono stati effettuati con farmaci antiossidanti. E' stato a lungo ritenuto che la somministrazione di vitamina E potesse inibire l'incremento di gap-junctions, ridurre la sintesi di trombossani e aumentare la sintesi di prostaciline. In realtà non c'è accordo in merito all'efficacia, mentre ben noti oramai sono i rischi associati ad un sovradosaggio: sepsi, enterocolite necrotizzante, emorragia intraventricolare, aumento di mortalità. Il motivo principale della parziale inefficacia del trattamento con vitamina E è che essa è solo uno dei molteplici componenti del patrimonio antiossidante proprio di ogni individuo e peraltro non il singo-

lo fattore in causa nella patogenesi del danno ossidativo retinico. Gli attuali orientamenti sono verso la supplementazione di *luteina*, costituente fondamentale dell'epitelio pigmentato retinico.

## 4 – La Retinopatía del Prematuro

---

## 4.1 – Epidemiologia

### **DISTRIBUZIONE NEL MONDO**

In generale, le retinopatie rappresentano una frequente causa di cecità in tutte le classi di età. Negli USA ci sono 15 milioni di persone affette da AMD (*age-related macular degeneration*, degenerazione maculare età-correlata), il 20% delle quali di età 65-74 anni ed il 30% oltre i 74 anni; 1,6 milioni presentano una forma essudativa. Nella popolazione in età lavorativa ci sono più di 20 milioni (oltre il 7% della popolazione) affetti da diabete; il 50% dei diabetici presentano una retinopatia diabetica oltre i 25 anni di età. Nei bambini, la ROP è una causa frequente di grave deficit visivo e di cecità. Ogni anno nascono circa 460.000 pretermine (11% circa della popolazione), 2000 dei quali sviluppano una forma grave di ROP, nonostante il trattamento<sup>51</sup>.

La frequenza della ROP è molto cambiata nel corso dei quasi 70 anni trascorsi dalla sua prima descrizione.

Confrontando i dati della prima epidemia che risalgono al 1940-1950 circa, ad oggi, l'incidenza risulta aver subito varie oscillazioni. Infatti negli anni '40-'50 ci furono negli Stati Uniti circa settemila casi di cecità per Retinopatia del Pretermine: furono molti dunque ad esserne colpiti, tenendo conto che la sopravvivenza di un neonato con peso minore di 1000 g era dell'8%. E' proprio a partire da questi anni che la medicina prende consapevolezza della gravità di questa patologia, impegnandosi nella ricerca delle cause responsabili della sua evoluzione.

Come dimostrato dagli studi di Campbell sull'ossigenazione del prematuro, i dati cambiarono notevolmente e il numero di neonati con perdita della vista a causa di ROP si ridusse a circa cinquecento neonati l'anno, sempre negli Stati Uniti<sup>2</sup>.

Questo fu solo l'inizio. Infatti, mentre da un lato gli studi sull'ossigeno-terapia condussero ad una temporanea riduzione dell'incidenza di ROP, dall'altro permisero la sopravvivenza di neonati sempre più piccoli e il conseguente riacutizzarsi della pa-

tologia, dimostrando che l'ossigeno non era il solo fattore responsabile della ROP ma anche la prematurità, soprattutto se associata ad un basso peso.

Nel periodo successivo al 1990 non sono stati svolti studi epidemiologici che possano informare sull'incidenza della Retinopatia nel mondo.

Oggi, al contrario, sono disponibili dati di diversi studi; tuttavia, per valutare la frequenza di questa patologia, dovremmo poter confrontare in modo univoco dati provenienti da paesi ad alto, medio e basso reddito; ciò risulta, al contrario, molto difficile a causa dei diversi metodi di valutazione clinica e di gestione sanitaria della prematurità nelle diverse aree del pianeta. In ogni Paese i dati non vengono raccolti in base a indici rappresentativi uguali per tutti e ed quindi possibile commettere degli errori nel trarre delle conclusioni generali. Per esempio i dati relativi ai trattamenti effettuati in Paesi a medio-basso reddito possono sottostimare il numero dei neonati a basso peso alla nascita poiché nella maggior parte dei casi, essendo troppo piccoli, vengono trasferiti in centri regionali per essere trattati.

Un'altra potenziale fonte di *bias* riguarda la diversa interpretazione dei vari segni di ROP nei test di screening: tra gli oftalmologi appartenenti a paesi a basso e medio livello di sviluppo alcuni seguono le linee guida americane come valori di riferimento, altri linee guida inglesi, altri ancora hanno stabilito criteri indipendenti

Tali elementi non permettono di determinare con dati attendibili l'incidenza di ROP; ne confermano tuttavia la diffusione in tutto il mondo, con una frequenza maggiore nei paesi ad alto sviluppo, che garantiscono una vita ai bambini di poche settimane, e inferiore nei paesi meno sviluppati, che non hanno la possibilità di mantenere in vita neonati prematuri.

I dati dello studio ETROP (ultimo RCT in ordine di tempo riportante dati epidemiologici), sono riportati in *Tab. 4.1-I*<sup>19,52</sup>



Peso alla nascita (g)	ROP TOTALI (%)	PRESOGLIA (%)
<750	938 (40,4)	487 (51,9)
750-999	959 (41,3)	304 (31,7)
1000-1250	423 (18,2)	65 (15,4)
<b>&lt;1251</b>	<b>2320 (100)</b>	<b>856 (36,9)</b>

Tab. 4.1-I: Incidenza della ROP negli arruolati ETROP (n=6998)

### INCIDENZA IN ITALIA

Sono disponibili dati presentati al Convegno Nazionale del Gruppo di Studio ROP del 2005, dai quali emerge che su un totale di 322 neonati arruolati il 59% sviluppa la Retinopatia del Prematuro, una percentuale sovrapponibile a quella del precedente studio del '92-'93<sup>53</sup> (Fig. 4.1.1).

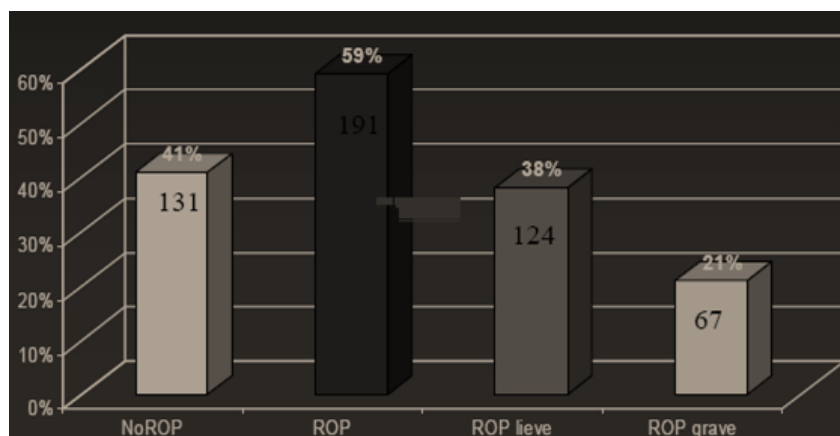


Fig. 4.1.1: Distribuzione della ROP in Italia. Fonte: GSI ROP, 2005

Negli anni 1992-2005 il numero di casi non risulta aumentato; al contrario, si è registrata una diminuzione del 30% di ROP severa, a scapito però di un coinvolgimento sempre maggiore della popolazione neonatale più a rischio. Analizzando i dati epidemiologici in base all'età gestazionale e al peso alla nascita risulterebbe, infatti, che i neonati prematuri di circa 26 settimane e con peso <750gr possono sviluppare

ROP nelle settimane successive dopo la nascita, mentre neonati di 29-30 settimane con 1250-1499 gr di peso la patologia può comparire immediatamente dopo il parto.

#### INCIDENZA IN TOSCANA

In Toscana nell'anno 2000 si sono stimati tra i nati vivi 1250 neonati a rischio ROP, il 30% dei quali è stato partorito in strutture prive di assistenza intensiva neonatale. Tra i soggetti a rischio 265 (pari al 21,2%) hanno sviluppato la Retinopatia del Pretermine e fra questi 5,3 all'anno presentavano un esito visivo sfavorevole con alti rischi di cecità grave o ipovisione.

#### INCIDENZA LOCALE (SOD NEONATOLOGIA AOUC)

Sono disponibili dati aggiornati all'Agosto 2008 (*Tab. 4.1-II*). Presso la TIN della SOD Neonatologia di Careggi sono stati ricoverati, nel periodo Aprile 2004-Agosto 2008, 176 nati pretermine a rischio (peso alla nascita < 1250 g), 24 dei quali (pari al 13.64% del totale) hanno sviluppato una ROP; 12 di questi sono stati trattati per ROP pre-soglia con laser e/o iniezione intravitale di molecole anti-VEGF (v. oltre).

Peso alla nascita (g)	ROP TOTALI (%)	PRESOGLIA (%)
<750	12 (50,0)	6 (50,0)
750-999	8 (33,3)	4 (50,0)
1000-1250	4 (16,7)	2 (50,0)
<b>&lt;1251</b>	<b>24 (100)</b>	<b>12 (50,0)</b>

*Tab. 4.1-II: incidenza della ROP presso TIN AOUC (n=176)*

I dati, pur aggregati e gravati dal *bias* rappresentato dalla diversa numerosità delle popolazioni, evidenziano due elementi: la netta riduzione della diagnosi di ROP

(dal 68% dell'ETROP e 59% del GSI ROP 2005 al 13.6% della TIN di Careggi), nonostante l'implementazione di protocolli di screening accurati e l'esperienza degli operatori; l'aumento relativo dei casi di ROP grave (pre-soglia) soggetta a trattamento: dal 12,2% dell'ETROP, al 21% del GSI ROP 2005, al 50% della TIN di Careggi. Meno ROP, ma più ROP gravi fra quelle diagnosticate (da una su otto ad una su due).

Tali dati suggeriscono che da un lato il livello e l'appropriatezza della *care* del pretermine garantito da una struttura di III livello considerata fra le migliori in Italia garantisce una prevenzione primaria della ROP più efficace che in altre strutture; dall'altro, che la maggiore sopravvivenza di pretermine ELBW garantita da tali livelli di intensità di cure porta con sé un ineluttabile aumento dei casi di ROP gravissima (in zona I o zona II posteriore, anche AP-ROP); il 50% delle ROP pre-soglia (o Tipo I, comunque da trattare), infatti, compare in neonati sotto i 750 g alla nascita.

Ciò rappresenta uno degli elementi principali che motivano la ricerca di nuove strategie terapeutiche della ROP, volti a superare, almeno in parte, i limiti delle tecniche sviluppate nel corso degli ultimi 20 anni. Infatti, se per un verso la crioterapia, la laserterapia, la chirurgia retinica ab externo (cerchiaggio) e la vitrectomia hanno consentito di salvare dalla cecità molti dei prematuri nati negli ultimi decenni, per converso tali approcci appaiono gravati da due principali limiti: l'esecuzione spesso tardiva e l'alta invasività.

## 4.2 – Classificazione

Come accennato sopra, la localizzazione e la stadiazione della malattia sono definiti dalla ICROP revisionata (*International Classification of Retinopathy of Prematurity, revisited*) pubblicata nel 2005. Questa classificazione rappresenta un'evoluzione della precedente classificazione del 1984, proposta da ventitré oculisti di undici nazioni diverse. Due successive revisioni sono state pubblicate nel 1987 e, appunto, nel 2005<sup>54-56</sup>.

Il nuovo sistema classificativo ha rapidamente sostituito le precedenti classificazioni, soprattutto sia il fatto che è stata acquisita una migliore comprensione dei meccanismi alla base della malattia, sia perché in precedenza risultava difficile confrontare i risultati dei trattamenti, dal momento che spesso lo stadio trattato non era univocamente definito. chiaro quale stadio della malattia veniva trattato..

La classificazione internazionale della ROP, utilizzata ai fini di una corretta codificazione dei dati epidemiologici, prevede l'utilizzo di un particolare schema grazie al quale le lesioni vengono distinte in base alla loro *localizzazione* ed *estensione*.

### **LOCALIZZAZIONE**

Il fondo oculare è stato suddiviso in tre zone concentriche centrate sul disco ottico (*Fig.4.2.1*):

- La zona I, è la più posteriore, è circolare, il suo raggio sottende un angolo di 30° e si estende per una distanza pari al doppio di quella compresa tra il disco ottico ed il centro della macula.

- La zona II, dal limite della zona precedente, si estende nasalmente fino ad un punto tangenziale all'ora serrata e, temporalmente, fino all'equatore.

- La zona III, comprende la porzione di retina temporale posta anteriormente alla zona 2. Questa è la parte vascularizzata più tardivamente nei prematuri ed è quella più frequentemente interessata dalla ROP.

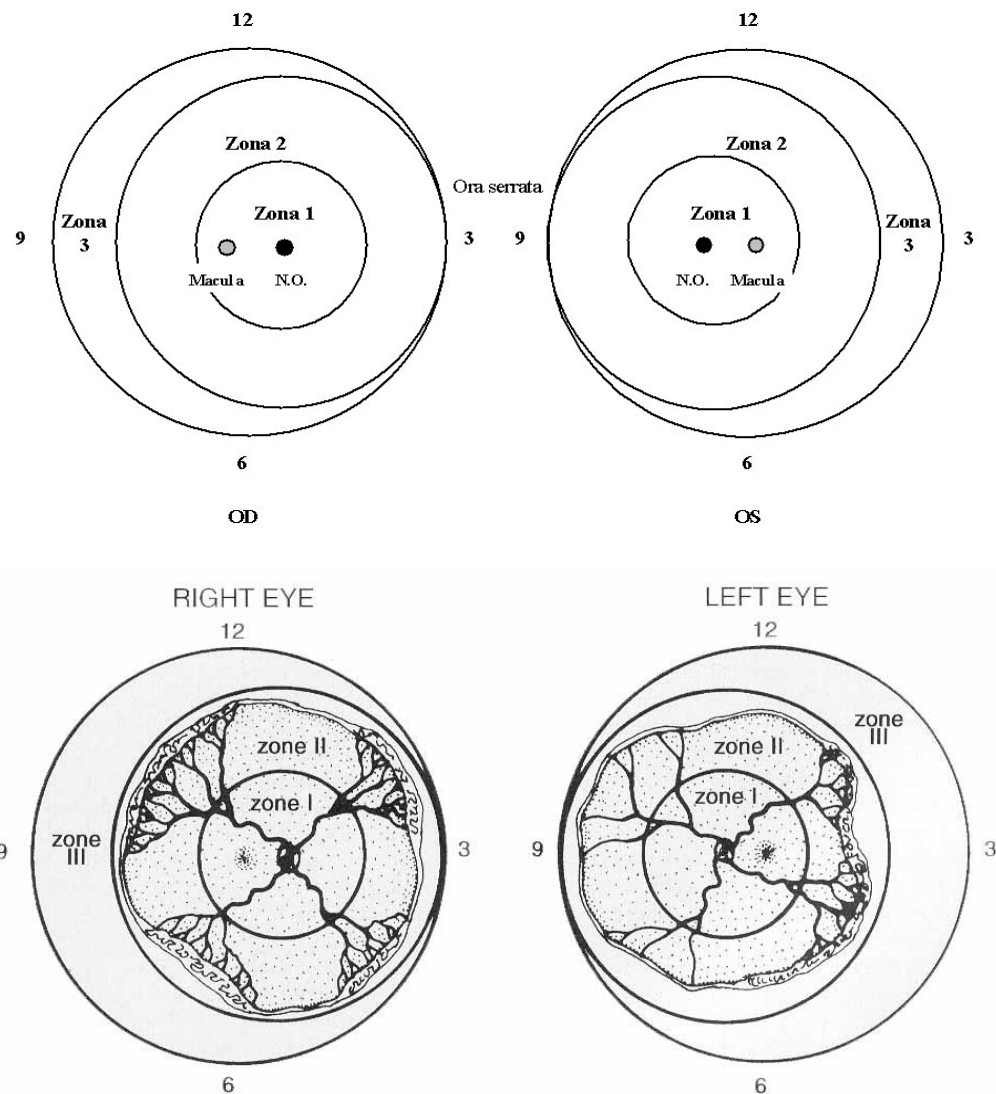


Fig. 4.2.1: Schema della localizzazione della ROP. In basso, rappresentazione schematica di una ROP 3 in zona 2

## ESTENSIONE

L'estensione della lesione è valutata in funzione della localizzazione oraria (ad esempio la posizione alle ore tre corrisponde alla porzione nasale dell'occhio destro e a quella temporale dell'occhio sinistro) e dell'angolo sotteso dalle alterazioni anatomicopatologiche di ciascuno stadio, angolo espresso come numero di settori orari (una "ora" corrisponde ad un angolo di 30°).

## STADIAZIONE

Un altro parametro utilizzato nella classificazione internazionale è lo *Stadio della malattia* (cioè il grado dell'anomala risposta vascolare o fibrovascolare). Le immagini qui riportate sono quelle considerate standard per la diagnosi e la stadiazione della ROP, riportate nella ICROP.

Sono stati definiti cinque stadi.

**Stadio 1:** linea di demarcazione. La linea di demarcazione è una linea piatta, bianca, che giace sul piano retinico e separa la retina avascolare dalla retina vascolarizzata (Figg. 4.2.2.a – 4.2.2.b).

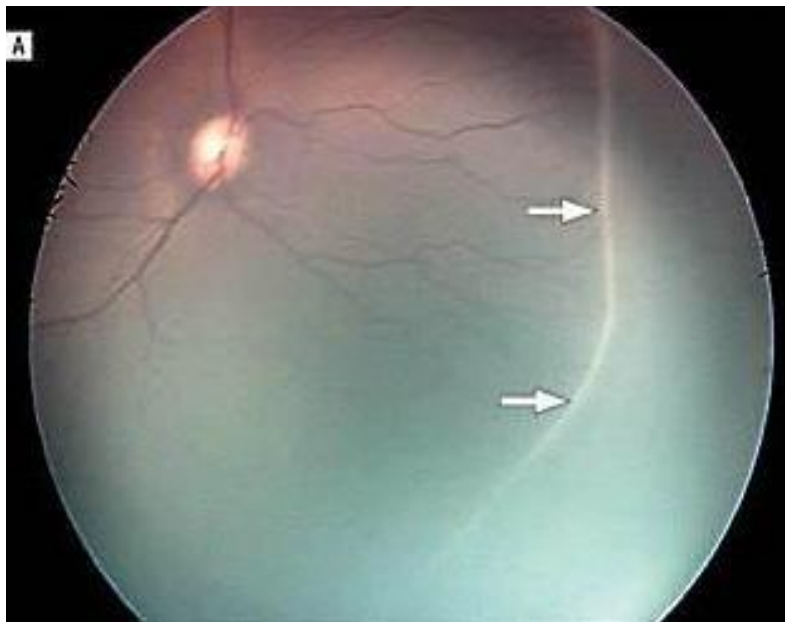
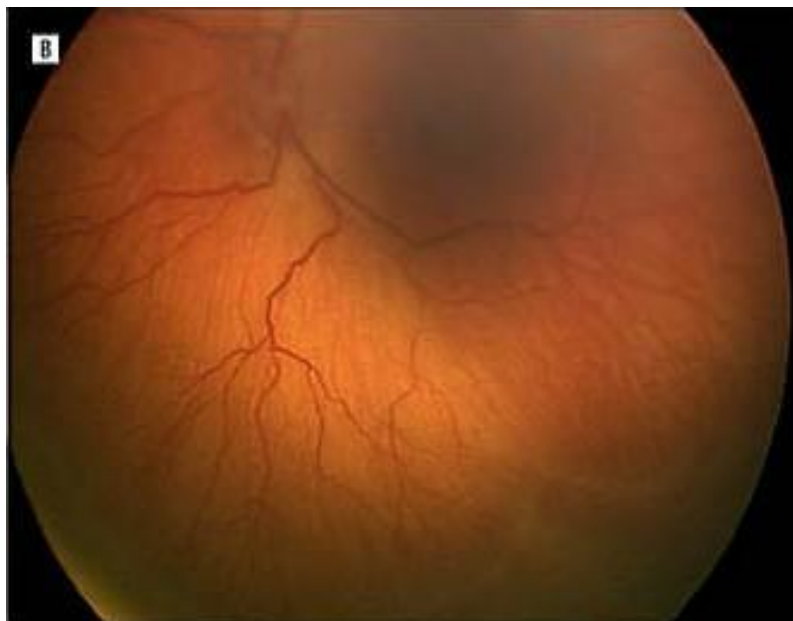
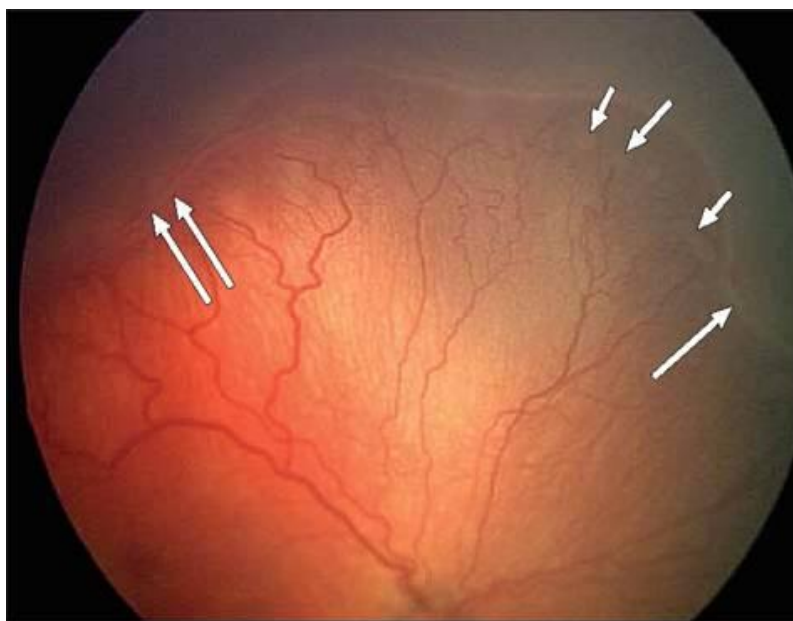


Fig. 4.2.2.a: ROP 1



*Fig. 4.2.2.b: ROP 1*

**Stadio 2:** cresta. La cresta è localizzata in corrispondenza della linea di demarcazione e si eleva sul piano retinico. La proliferazione neovascolare è intraretinica (Fig. 4.2.3).



*Fig. 4.2.3: ROP 2. Le doppie frecce indicano un settore di ROP 3*

**Stadio 3:** proliferazione fibrovascolare extraretinica. La proliferazione invade il corpo vitreo. In base all'entità dell'infiltrazione vitreale, si distinguono 3 gradi: lieve, moderato, severo (*Fig. 4.2.4*).



*Fig. 4.2.4: ROP 3 severa*

**Stadio 4:** distacco di retina parziale

**4A :** distacco extrafoveale, che non interessa la macula. Il sollevamento, che origina in corrispondenza di un'area di proliferazione fibrovascolare, ha morfologia concava (*Figg. 4.2.5.a - 4.2.5.b*)

**4B :** distacco foveale.

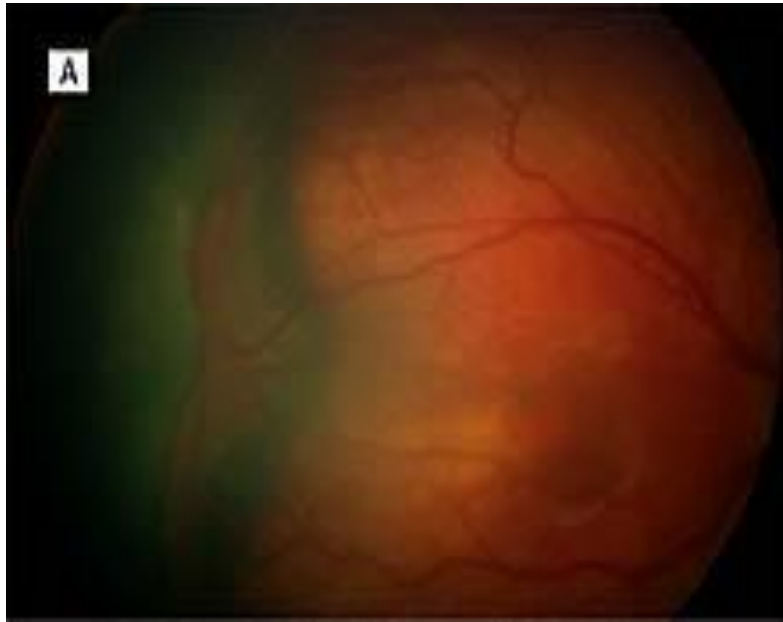
**Stadio 5:** distacco di retina totale. Il distacco totale trazionale ha morfologia imbutiforme. La morfologia più frequente è:

imbuto aperto anteriormente e posteriormente (*Fig. 4.2.6.a*).

imbuto chiuso anteriormente e posteriormente

imbuto aperto anteriormente e chiuso posteriormente (*Fig. 4.2.6.b*).





*Fig. 4.2.5.a: ROP 4A*



*Fig. 4.2.5.b: ROP 4B*

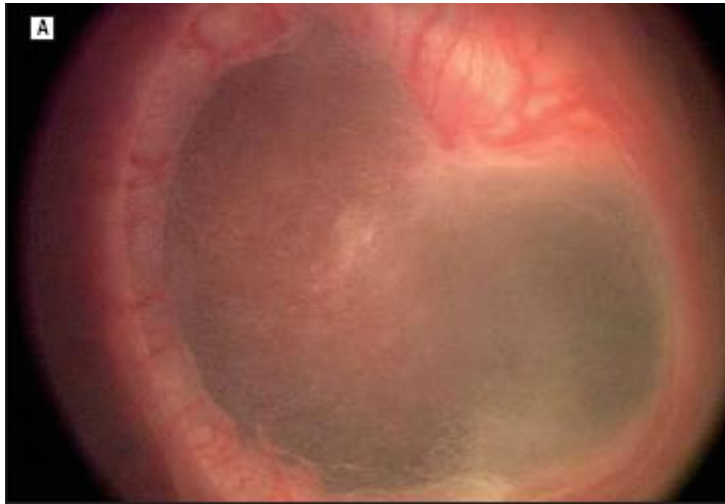


Fig. 4.2.6.a: ROP 5

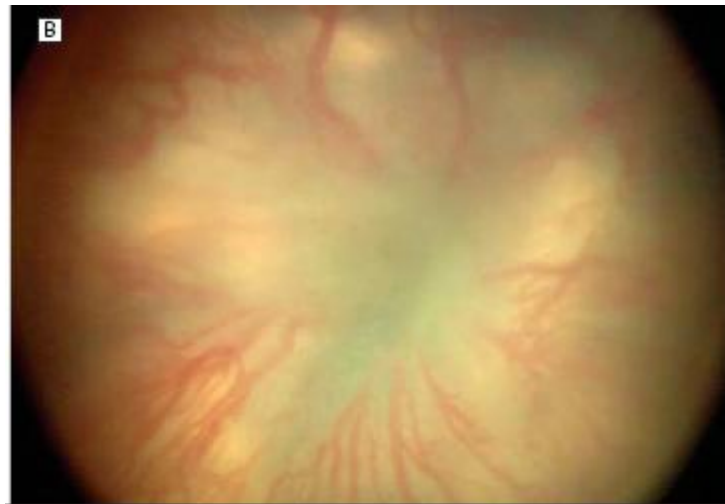


Fig. 4.2.6.b: ROP 5

**Plus disease:** s'intende per componente *plus*, la congestione e tortuosità dei vasi retinici (Fig. 4.2.7). Può evolvere verso la congestione dei vasi iridei, la rigidità pupillare, l'*haze* vitreale. Vengono descritti uno stadio iniziale di congestione retinica, detto *pre-plus*, ed uno stadio *plus* conclamato che viene indicato con il segno + (Es.: ROP stadio 2+).

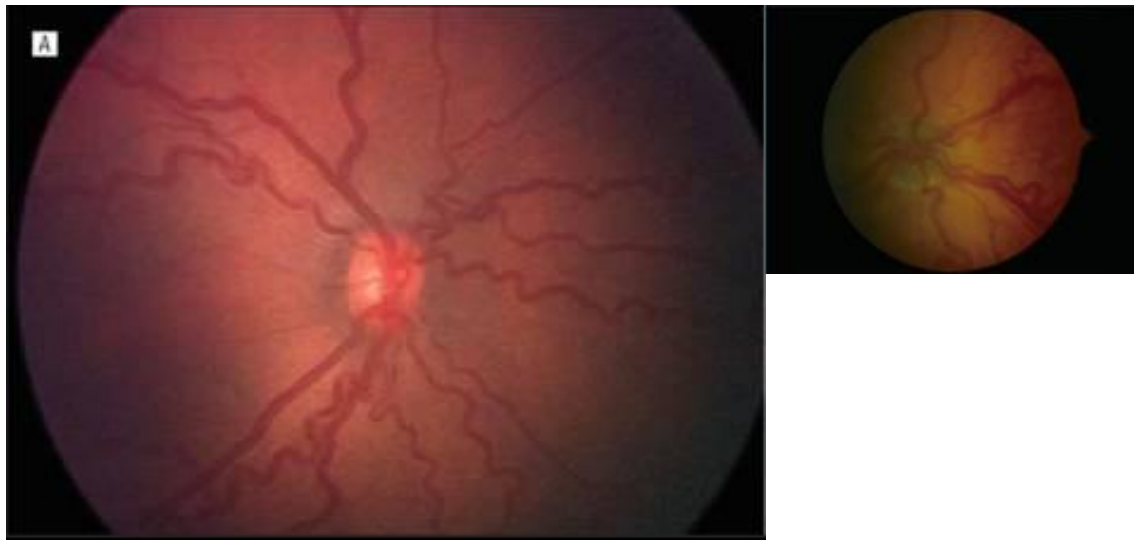


Fig. 4.2.7: plus disease; nell'inserto, una immagine standard

- **Aggressive Posterior ROP:** la ICROP definisce infine, come sopra accennato, la AP-ROP (*Aggressive Posterior ROP*) (Fig. 4.2.8), una forma severa e a rapida progressione.

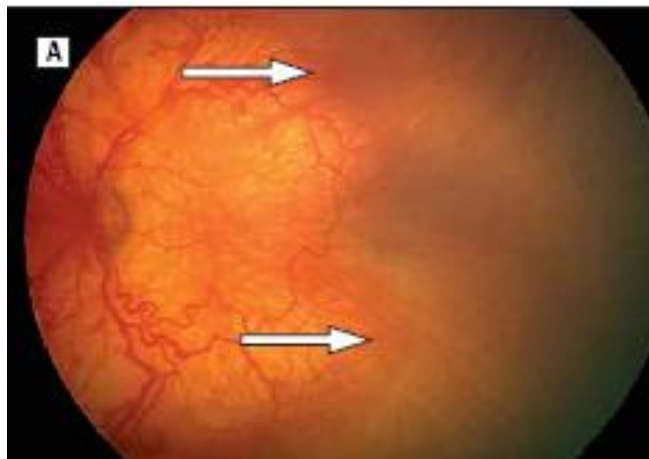


Fig. 4.2.8: AP-ROP

La AP-ROP è tipicamente (ma non esclusivamente) osservabile in neonati di bassissimo peso alla nascita ed è caratterizzata dalla localizzazione posteriore, dalla prevalenza di plus e dalla natura patologia-definita della malattia. Se non trattata, essa di solito progredisce a ROP 5. La AP-ROP si riscontra più frequentemente in zona I, ma può verificarsi anche in zona II. E' presente una marcata dilatazione e tortuosità

dei vasi al polo posteriore in tutti i 4 quadranti, con *shunts* intervascolari intraretinici. Possono verificarsi emorragie al confine fra retina vascolarizzata ed avascolare. La malattia progredisce in modo circumferenziale, rapidamente e tipicamente non attraversa gli stadi da 1 a 3. Può anche mostrarsi solo come un network piatto (*flat form*) di neovascolarizzazione e la giunzione fra retina vascolarizzata ed avascolare, che sembra ingannevolmente priva di elementi tipici della ROP e che può trarre in inganno l'osservatore meno esperto.

#### **CLASSIFICAZIONE ICD-9-CM**

Retinopatia del pretermine 362.20

cicatriziale 362.21

stadio

0 362.22

1 362.23

2 362.24

3 362.25

4 362.26

5 362.27

NOTA. La AP-ROP non è codificata. La ROP stadio 0, non prevista nella ICROP in alcuna delle sue versioni, è da ritenersi coincidente con la ROP in fase I (arresto e regressione vascolare, lieve *haze* vitreale per immaturità, persistenza moncone a. ialoidea).

## 4.3 – Diagnosi

### **OFTALMOSCOPIA BINOCULARE INDIRETTA**

L'osservazione del fondo oculare del prematuro costituisce un atto di fondamentale importanza che dovrà essere ripetuto almeno quindicinalmente (ogni settimana nei soggetti a maggiore rischio e comunque in accordo con le linee guida AAP-AAO-AAPOS riportate oltre e recepite dal GSI ROP). L'osservazione deve avvenire mediante oftalmoscopia binoculare indiretta. Si tratta forse del capitolo più rilevante dell'osservazione del prematuro in generale. È possibile effettuare questa manovra anche nei bambini intubati e attraverso le pareti trasparenti dell'incubatrice tenendo all'interno solo le mani e la lente (*Fig. 4.3.1.a-c*). Il personale di assistenza deve essere istruito ad assecondare le manovre dell'oculista, curando che esse non comportino problemi per il bambino, quali la desaturazione e la bradicardia oppure il distacco di qualche sensore.



*Fig. 4.3.1.a-b-c: Oftalmoscopia binoculare indiretta in isolet*

In genere è piuttosto difficile ottenere la necessaria midriasi massimale in questi soggetti: la letteratura è ricca di proposte e di avvertenze sui limiti e sui possibili rischi. Nella nostra esperienza il metodo più efficace e che per il momento non ha dato luogo a inconvenienti, salvo qualche rara bradicardia in bimbi molto fragili, peraltro senza conseguenze e ben controllabile, è l'uso di: una goccia di  $\alpha$ -tropicamide 1% e dopo 15' una goccia di  $\alpha$ -tropicamide coll 0,5% ed una di fenilefrina 2,5%

### **RETINOGRAFIA DIGITALE**



*Fig. 4.3.2: RetCam II*

Per la diagnosi, il follow-up, il riferimento a centri di trattamento, la comunicazione con i neonatologi e con i genitori, oltre che a fini medico-legali, è oggi ritenuta indispensabile l'osservazione della retina che può essere eseguita mediante oftalmo-

scopia digitale *RET CAM II* (Figg. 4.3.2, 4.3.3.a-b), con la quale una telecamera dotata di lenti permette di studiare sia il polo posteriore che la periferia della retina dei bambini. La RetCam, prodotta negli USA (Clarity Medical Systems, CA), nata per l'Oculistica Pediatrica, ma dal 2002 implementata con una lente per adulti, è uno strumento costituito da una unità mobile dotata di un monitor collegato ad una telecamera che permette di visualizzare in tempo reale l'intera retina del neonato, diagnosticando con precisione eventuali anomalie e verificando il decorso post-operatorio andando ad effettuare filmati e documentazioni. La camera (Fig. 4.3.3.b) viene appoggiata sulla cornea con l'interposizione di un gel e restituisce in tempo reale l'immagine del fondo retinico sul monitor. Con una lente da 130° è possibile esplorare tutta la retina fino all'ora serrata. E' possibile memorizzare le immagini, archivarle e confrontarle; è possibile anche effettuare fluorangiografie di approfondimento diagnostico. Con l'acquisizione delle immagini inviate ad altri Centri mediante internet, si può valutare e consigliare l'indirizzo terapeutico caso per caso.

Mediante l'osservazione si effettua la diagnosi degli stadi della malattia con la verifica dell'eventuale elemento prognostico sfavorevole rappresentato dalla comparsa della componente plus (congestione e tortuosità dei vasi retinici).

Un particolare interesse è costituito dalla significativa riduzione dello stress indotto al bambino rispetto all'oftalmoscopia indiretta<sup>57</sup>.



Fig. 4.3.3.a: RetCam II: testa ottica

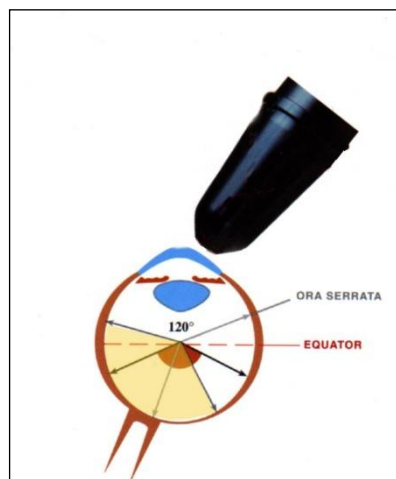


Fig. 4.3.3.b: RetCam II: angolo di esplorazione

## NUOVI SVILUPPI NELLA DIAGNOSI DELLA ROP

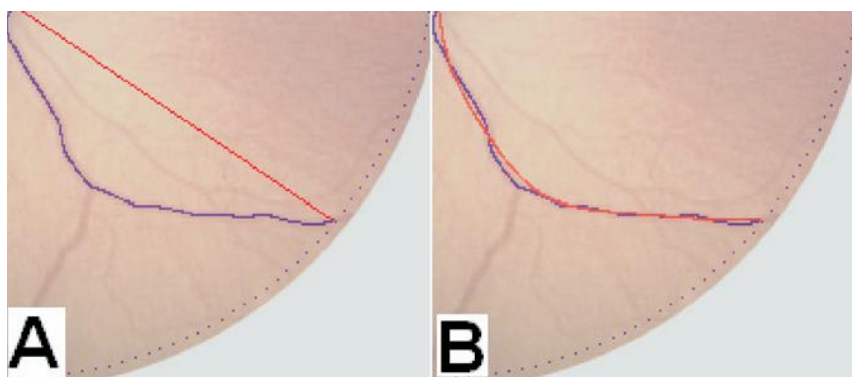
L'accurata e tempestiva determinazione della malattia è estremamente importante per concretizzare la possibilità di un esito favorevole nelle cure della ROP. Tuttavia, può sussistere, anche per gli esaminatori più esperti, la difficoltà nel valutare il grado di cambiamento vascolari nel polo posteriore. Uno studio di Wallace e coll. ha stato messo in evidenza che, prendendo in considerazione tre differenti oftalmologi esaminatori, può nascere un'indecisione nella definizione di presenza o assenza di malattia in 29 su 72 immagini della retina (il 40%)<sup>58</sup>. In aggiunta, sono presenti numerosi fattori di variabilità come, per esempio, il tipo di lenti oftalmiche utilizzati, la chiarezza dell'immagine, la dimensione del nervo ottico, la quantità di pigmentazione della retina sottostante, e la relativa entità di dilatazione e tortuosità. Pertanto, anche per gli esperti, la valutazione della quantità di anomalie vascolari della retina è spesso un "calcolo guidato". Ciò sottolinea il potenziale valore di un meccanismo che possa quantificare con precisione e coerenza nella vascolarità retinica la dilatazione e la tortuosità in neonati a rischio ROP.

Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse per una più possibile accurata misura del grado di dilatazione e tortuosità dei vasi retinici. In collaborazione con esperti nel settore informatico, è stato sviluppato un sistema computerizzato che, sulla base di immagini fornite dall'oftalmoscopia digitale, è in grado di seguire automaticamente i vasi retinici e quantificare il grado di tortuosità e dilatazione. Questa tecnologia è stata applicata per la prima volta nella misurazione della dilatazione e tortuosità dei vasi cerebrali negli angiogrammi. Dal completamento di alcuni studi pilota, il software è stato raffinato e denominata "*ROPtool*". Il programma dapprima era in grado di identificare costantemente i vasi maggiori per ogni immagine, per cui è stata aggiunta una funzione che ha permesso all'operatore di cliccare sui singoli vasi. Successivamente si è aggiunta la possibilità di tracciare il confine dei vasi selezionati per la misura la distanza dal nervo ottico utilizzando la visione che avrebbe un esaminatore con una lente da 28 D centrata sul nervo ottico. Questo metodo di visualizzazione sottende un angolo di circa 30° nella visione della retina posteriore, e include quei segmenti di arterie e venule che generalmente vengono utilizzati per determinare la presenza o as-



senza della componente plus. Un altro problema degli studi pilota è stata la misurazione della tortuosità dei vasi che si è ottenuta dal rapporto tra la lunghezza totale dei vasi calcolata sulla distanza dal nervo ottico e la lunghezza di una linea retta tracciata tra i punti di inizio e di fine dei vasi stessi.

Tuttavia, questa semplice formula ha subito inizialmente il limite dell'aumento artificiale dell'indice di vasi che, pur essendo privi di tortuosità, venivano interpretati come tali semplicemente per essere caratterizzati da una maggiore grandezza e da una più accentuata curva graduale. Il programma è stato quindi raffinato per scegliere 200 punti lungo il vaso (circa 40 pixel) per disegnare una curva in grado di collegare tali punti riducendo la possibilità di errore (*Figg. 4.3.4.a, 4.3.4.b*).



*Fig. 4.3.4.a: ROPtool*

*Fig. 4.3.4.b: ROPtool*

La misura della tortuosità utilizzata da ROPtool è ora il rapporto tra la lunghezza totale del vaso per la lunghezza di questa curva, dando una misura più accurata dell'indice di tortuosità. Sono state inoltre aggiunte funzioni per permettere al gestore di segnare i confini del nervo ottico e il centro della macula. Infine l'interfaccia è stata modificata in modo da renderlo facilmente utilizzabile dall'utente e per includere funzioni come “taglia”, “unisci”, “elimina”, e “annulla” il tracciato dei vasi (*Fig. 4.3.5*).

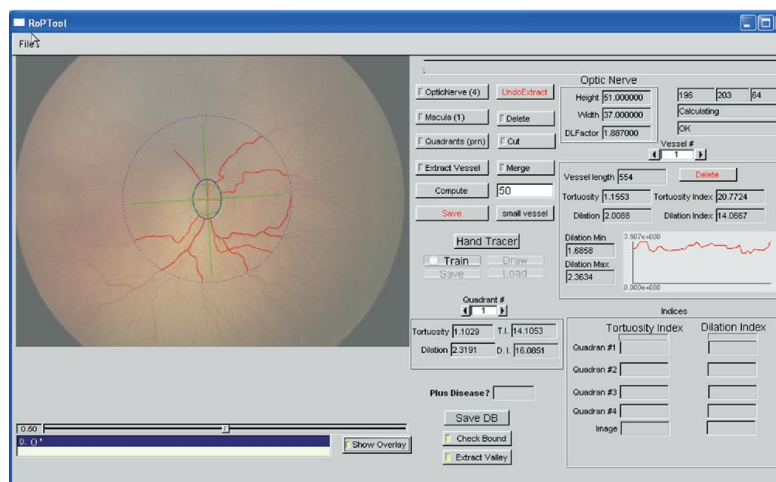


Fig. 4.3.5: Interfaccia del software ROPtool

Diversi studi pilota sono stati completati, e i risultati hanno portato al perfezionamento del programma. La versione definitiva di ROPtool è stata sperimentata per la risoluzione di eventuali problemi, determinare la sua affidabilità (ripetibilità), valutare la precisione nella misurazione della dilatazione e tortuosità, e per calcolare adeguate soglie numeriche utili nella determinazione della componente plus e pre-plus della malattia. In sintesi, il software ROPtool, che è stato sviluppato per tracciare automaticamente vasi retinici, misura la tortuosità di ogni vaso sulla base di immagini standard della malattia, ed è attualmente in grado di determinare se un occhio ha un livello di tortuosità sufficiente a diagnosticare lo stadio della ROP. Lo studio definitivo ha evidenziato soddisfacenti livelli di sensibilità (95%) e specificità (78%) nel rilevamento dei segni caratteristici di tortuosità vascolare sufficienti a definire la malattia<sup>59</sup>.

## 4.4 – Screening

Data la natura sequenziale della progressione della ROP ed alla luce dei benefici ottenibili, con un trattamento temporalmente appropriato, in termini di riduzione del rischio di deficit visivo grave documentati in letteratura, oggi si ritiene che la valutazione funduscopica dei nati pretermine da parte di un oculista esperto sia parte integrante della *care* necessaria nell'approccio a tale patologia; al contempo, tutti i neonatologi dovrebbero essere consapevoli di quanto il corretto timing di tali controlli.

Nel 2006 è stato pubblicato un Joint Statement da parte della AAO (American Academy of Ophthalmology), della AAP (American Academy of Pediatrics) e della AAPOS (American Association of Pediatric Ophthalmology and Strabismus) finalizzato alla messa a punto di linee-guida condivise per la conduzione di screening efficaci, oltre che efficienti in termini di riduzione dello stress neonatale. Esso rappresenta la revisione di due precedenti statements<sup>60-62</sup>.

Ancor più recentemente si sono affacciate alcuni nuovi ed assai interessanti lavori, che identificano i neonati a rischio non tanto sulle caratteristiche salienti presenti alla nascita (peso ed età gestazionale), ma piuttosto attraverso lo studio di parametri tipici della vita extra-uterina, quali, principalmente, il tasso di incremento ponderale e il dosaggio ematico di alcune molecole coinvolte nella fisiopatologia dello sviluppo vascolare retinico (e non solo).

### **RACCOMANDAZIONI DERIVANTI DAL JOINT POLICY STATEMENT AAO-AAP-AAPOS 2006**

Qualsiasi programma di screening disegnato per migliorare gli standard di cura presenta alcuni difetti intrinseci (quali, ad esempio, il sotto- o sovra-riferimento); data la natura stessa dello screening esso non può, di fatto, eguagliare la precisione ed il rigore di un trial clinico controllato. Per tale ragione, lo Statement di cui qui si riferisce, ha prodotto delle raccomandazioni (non scientificamente cogenti, ma clinicamente utili), basate sulla realtà statunitense. Molte di esse, di fatto, sono applicabili nella

realità delle nostre TIN e sono state recepite nelle linee-guida suggerite dal Gruppo di Studio Italiano per la Retinopatia del Pretermine.

1. Destinatari: neonati di peso alla nascita  $< 1500$  g o di età gestazionale  $\leq 30$  settimane; neonati di peso alla nascita fra 1500 e 2000 g,  $> 30$  settimane e con decorso clinico instabile, comunque considerati ad alto rischio dal punto di vista neonatologico
2. Modalità: oftalmoscopia binoculare indiretta in midriasi farmacologica; una sola osservazione è ritenuta sufficiente solo se consente di visualizzare l'intero campo retinico
3. Accorgimenti anti-stress: anestesia topica, ciuccio, saccarosio orale
4. Esecutori: oftalmologi con conoscenze ed esperienza sufficienti a garantire una adeguata identificazione della localizzazione e dei cambiamenti sequenziali della ROP, basata sulla ICROP revisionata (2005)
5. Inizio dello screening della ROP acuta: basato sull'età del neonato. L'insorgenza di ROP gravi correla meglio con l'età post-mestruale (= età gestazionale – EG - alla nascita + età cronologica) che con l'età post-natale. I neonati di minor EG sviluppano la ROP più tardivamente;
6. Controlli successivi: dovrebbero essere raccomandati dall'oftalmologo sulla base dei reperti retinici, classificati secondo la ICROP. Viene suggerito il calendario seguente:
  - Ogni 7 giorni o meno:
    - ROP 1 o 2 in zona I
    - ROP 3 in zona II
  - Ogni 7-14 giorni:
    - Immaturità della vascolarizzazione in zona I – no ROP
    - ROP 2 in zona II
    - ROP in regressione in zona I
  - Ogni 14 giorni:
    - ROP I in zona II
    - ROP in regressione in zona II
  - Ogni 14-21 giorni:
    - Immaturità della vascolarizzazione in zona II – no ROP
    - ROP 1 o 2 in zona III
    - ROP in regressione in zona III

La presenza di plus disease in zona I o II, secondo lo statement, suggerisce che la laser-ablazione periferica sia preferibile alla osservazione.

Età al primo esame oftalmoscopico (settimane)		
Gestazionale alla nascita	Postmestruale	Cronologica
22 <sup>†</sup>	31	9
23 <sup>†</sup>	31	8
24	31	7
25	31	6
26	31	5
27	31	4
28	32	4
29	33	4
30	34	4
31 <sup>‡</sup>	35	4
32 <sup>‡</sup>	36	4

\* La tabella fornisce un calendario per l'identificazione di ROP pre-soglia con una confidenza del 99%; di solito, ben prima di qualsiasi trattamento necessario

<sup>†</sup> La raccomandazione deve essere considerata tale e non basata sull'evidenza, per neonati di età alla nascita pari a 22-23 settimane, dato il basso numero di sopravvissuti

<sup>‡</sup> Ove necessario

*Tab. 4.4-I: Temporizzazione della prima valutazione oftalmologica basata sull'età gestazionale alla nascita.*

7. All'epoca della pubblicazione dello statement i reperti retinici che richiedevano trattamenti ablativi erano già stati rivisti in accordo con lo studio ETROP; il reperto di una ROP soglia era, già all'epoca, non più considerata il tempo ottimale per il trattamento, ma già tardivo. La ROP di tipo I (cioè le forme da trattare) era in corso di definizione.
8. La conclusione delle osservazioni della ROP acuta dovrebbe essere basata sull'età e sui reperti oftalmoscopici:
  - a. Vascolarizzazione retinica completata senza precedente ROP in zona I o II; controllo ulteriore possibilmente indicato qualora sussistano dubbi sull'età postmestruale (< 35 sett.) o sulla zona;
  - b. Vascolarizzazione retinica completata
  - c. Età postmestruale > 45 sett. e assenza di ROP presoglia (ROP 3 in zona II, qualsiasi ROP in zona I) o peggiore

- d. Regressione della ROP; con particolare cura nell'escludere la presenza di neovasi in grado di riattivarsi e progredire
- 
- 9. Comunicazione con I genitori da parte di membri dello staff; è considerata molto importante; i genitori devono essere a conoscenza dell'esecuzione degli esami oftalmologici e del fatto che il bambino abbia una ROP, con aggiornamenti successivi sulla sua progressione. Viene suggerita l'opportunità di discutere in merito ai possibili esiti della ROP, della quale è altamente consigliabile che rimanga traccia.
  - 10. Le responsabilità dell'esecuzione degli esami e del follow-up di neonati a rischio di ROP devono essere attentamente definite in ogni TIN, eventualmente concordando specifici criteri di comportamento a seconda delle diverse situazioni logistiche. Tali criteri devono essere registrati e devono essere in grado di attivare automaticamente l'oftalmologo. Qualora venga programmata la dimissione o il trasferimento ad altro ospedale prima che si siano verificate le condizioni di cui al punto 8, ovvero qualora sia stato eseguito un trattamento e la cicatrizzazione non sia ancora completata, occorre assicurare la disponibilità di un adeguato controllo oculistico nella nuova sede, indicando con chiarezza quali esami sono necessari e con quale tempistica e prendendo gli opportuni provvedimenti. Qualora ciò non sia possibile, si deve evitare di dimettere o trasferire il neonato.
  - 11. Sia i pediatri che le altre figure sanitarie del territorio che prendono in carico un neonato affetto da ROP (trattato o meno) devono essere a conoscenza del fatto che tali pazienti sono a rischio di altri disturbi visivi, quali lo strabismo, l'ambliopia, la miopia. Per tale ragione è raccomandato un follow-up oftalmologico a distanza dopo la dimissione.

Come detto, gran parte di tali raccomandazioni fanno parte (in alcuni casi da molto prima della loro pubblicazione) del bagaglio operativo di numerose TIN italiane. La SOD Neonatologia e la SOD Oftalmologia Pediatrica dell'Azienda Ospedalie-

ro-Universitaria Careggi di Firenze nel 2001 hanno congiuntamente implementato un insieme di procedure e documenti per lo screening, il trattamento ed il follow-up dei neonati a rischio di ROP.

#### **NUOVI CRITERI PER LA SELEZIONE DEI NEONATI A RISCHIO DI ROP E DESTINATARI DELLO SCREENING**

Uno dei limiti principali degli screening per la ROP basati sull'osservazione oftalmologica risiede nella natura stessa di tali esami, che sono più di tipo diagnostico che predittivo. In effetti, si calcola che il 90-95% dei neonati sottoposti a screening oftalmologico non sono mai stati trattati per la ROP. Inoltre, l'oftalmoscopia è altamente stressante per i neonati.

Un altro limite strutturale degli attuali protocolli di screening è che essi si limitano a controllare i neonati in attesa dell'eventuale sviluppo di una ROP. Sarebbe necessario sviluppare e validare un sistema che allerti il reparto prima che la patologia (spesso tumultuosa e rapidamente evolutiva) si sviluppi.

Inoltre, dato che molti aspetti patogenetici della ROP sono tuttora non chiari, la possibilità di identificare precocemente i neonati a rischio di ROP potrebbe consentire di stabilire delle relazioni fra situazione clinica, sviluppo extrauterino, comorbidità e rischio di ROP. Ad esempio, alcuni studi hanno identificato una relazione fra basso tasso di incremento ponderale, bassi livelli di IGF-1 e alto rischio di ROP<sup>63</sup>. In pazienti di questo tipo, alcune strategie di supporto allo sviluppo ponderale potrebbero essere giustificate, in assenza di altri fattori, dalla evidenziazione di una condizione di rischio significativo per lo sviluppo di ROP.

Un altro problema è rappresentato dal fatto che a volte i neonati a rischio di ROP prossimi alla dimissione non vengono dimessi perché sul territorio non troverebbero oculisti esperti nella ROP. Un sistema di screening dovrebbe essere in grado di allertare il pediatra di libera scelta al fine di evitare di perdere il controllo dei pur rari pazienti che sviluppano una ROP significativa dopo la dimissione.

Un altro elemento da valutare è il carico di lavoro degli oculisti coinvolti nello screening, che potrebbe ridursi significativamente qualora dovessero esaminare i soli neonati a rischio reale di ROP. C'è, d'altra parte, da considerare, che questo potrebbe tradursi in una minore possibilità di training.

Esiste, in definitiva, la necessità di adottare nuovi approcci allo screening della ROP che siano facilmente eseguibili, sicuri, efficaci riguardo ai costi e con alta sensibilità.

Smith et al hanno pubblicato nel marzo 2009 i risultati di uno studio volto ad implementare un nuovo approccio allo screening della ROP, derivato dal precedente WINROP (*Weight, Insulin-like growth factor 1, Neonatal, ROP*) basato sulla sola valutazione del tasso di incremento ponderale postnatale precoce in neonati pretermine, senza la concomitante esecuzione di prelievi seriati di siero per la determinazione dei livelli di IGF-1<sup>63,64</sup>. Le sole misurazioni settimanali del peso dalla nascita a 36 settimane postmestruali sono state inserite retrospettivamente in un algoritmo in grado di dare l'allarme nei casi in cui il tasso scendeva sotto un livello predefinito sulla base di precedenti studi. Nel 36% dei casi il sistema non ha dato allarme; nel 40% ha generato un allarme definito di basso rischio dopo la 32° settimana; nessuno di tali neonati ha sviluppato una ROP da trattare. Nel rimanente 24% dei neonati, il sistema ha generato un allarme a rischio alto o basso prima della 32° settimana; di questi, il 41% ha sviluppato una ROP evolutiva ed il 29% sono stati trattati per la presenza di una forma a grave rischio visivo. La mediana del tempo allarme-trattamento è risultata di 9 settimane. La mediana del tempo allarme-comparsa ROP è risultata di 5 settimane.

Il sistema, basato sulla misurazione settimanale del peso, ha dimostrato di identificare accuratamente quei neonati che avrebbero poi sviluppato, a distanza di diverse settimane o di mesi, una forma proliferativa di ROP da trattare secondo le indicazioni ETROP (pre-soglia). Con una attendibilità del 76% è anche in grado di identificare, nella specifica popolazione studiata, quei neonati che non dovevano essere considerati a rischio di ROP.



Sembrerebbe quindi che, impiegando una misurazione clinica non invasiva, semplice e sicura e comunque già routinariamente eseguita, sia possibile disegnare dei protocolli di screening individualizzati per identificare i soggetti a rischio di ROP. Allo stato attuale, lo screening della ROP è totalmente affidato all'oculista, con bassa efficienza in termini di costi e con il rilevante peso clinico gravante su neonati fragili che mal tollerano procedure diagnostiche fortemente stressogene come quelle eseguite dall'oculista (oftalmoscopia binoculare indiretta o RETCAM). Si può stimare, sulla base dei dati riportati nello studio, in circa 2/3 il risparmio di esami annui per singola TIN, pur tenendo conto del fatto che il sistema era stato concepito considerando la sensibilità più importante della specificità.

A nostro parere, il sistema dovrebbe ricevere un'adeguata validazione in popolazioni diverse, le quali, ad esempio, potrebbero presentare diversi tassi attesi di incremento ponderale rispetto a quelli riportati nello studio.

Presso la TIN dell'Azienda Ospedaliero - Universitaria Careggi di Firenze sarà a breve implementato un sistema di screening e allarme simile a quello sviluppato dagli Autori.

## 4.5 – Approcci storici e correnti al trattamento della ROP

L'impiego per il trattamento della ROP acuta del laser xenon ad arco e della crioterapia trans-sclerale iniziò verso la fine degli anni '60. Il trial multicentrico per la Crioterapia della ROP (CRYO-ROP)<sup>14,15</sup> stabilì per la prima volta l'effetto positivo della crioablazione della retina periferica avascolare. Fu osservata una riduzione significativa della progressione della ROP soglia, stadio al quale il rischio di cecità in assenza di trattamento era del 50%. La ROP soglia fu definita come 5 quadranti orari consecutivi o 8 cumulativi con proliferazione fibrovascolare extra-retinica, in zona I o II, in presenza di *plus disease* (tortuosità e dilatazione vascolare al polo posteriore, progressione verso la torbidità vitreale e rigidità pupillare). Ventitré centri USA parteciparono al CRYO-ROP e furono arruolati 9751 neonati di peso inferiore a 1251 g; 291 di essi, che progredirono a ROP soglia parteciparono al trial randomizzato e furono selezionati in modo casuale come casi o controlli. Il trattamento dei casi fu effettuato entro 72 ore dalle diagnosi di ROP soglia. Furono definiti come outcome sfavorevoli il distacco retinico posteriore, pieghe retiniche convolgenti la macula, la presenza di tessuto retrocristallinico. La crioterapia risultò ridurre significativamente l'outcome strutturale sfavorevole della ROP soglia a 49.3% a 3 mesi e 45,8% a 12 mesi. L'effetto benefico del trattamento risultò persistente nel tempo; a 10 anni di follow-up risultava una riduzione del 43.2% dell'outcome sfavorevole; a 15 anni il 30% degli occhi trattati ed il 59.1% dei controlli presentavano outcome sfavorevoli. La funzione visiva venne testata a 3 e 12 mesi tramite acuity cards (acuità di griglia monoculare). Il test venne tentato nel 95% dei pazienti e dimostrò differenze statisticamente significative a favore dei trattati. Per lo studio ai 5.5 anni dal trattamento vennero impiegate le tavole ETDRS; il tasso di outcome visivo sfavorevole dei trattati risultò pari a 47.1% rispetto al 61.7% dei controlli. Al follow-up a 10 anni, il 25.2% degli occhi trattati dimostrò un'acuità visiva pari o superiore a 20/40 (5/10 nella notazione decimale), rispetto al 23.7% dei controlli. Outcome visivo sfavorevole fu determinato nel 44.7% dei controlli vs 64.3% dei controlli. Il follow-up a 15 anni rivelò,

inoltre, che anche occhi con outcome strutturale definito favorevole al momento del trattamento potevano sviluppare nuovi distacchi retinici, evidenziando la necessità di lunghi periodi di follow-up degli occhi con ROP soglia.

Numerosi studi, basati sugli stessi criteri del CRYO-ROP, hanno dimostrato che la laser-coagulazione indiretta è almeno altrettanto efficace rispetto alla crioterapia nel prevenire gli outcome strutturali sfavorevoli.

Nonostante il trattamento, il, CRYO-ROP a 15 anni di follow-up dimostrò che il 44.4% degli occhi presentava un'acuità visiva pari o peggiore a 20/200 (1/10 nella notazione decimale); gli occhi trattati per ROP in zona I risultavano avere outcome strutturali e visivi significativamente peggiori rispetto a quelli trattati per ROP in zona II<sup>65</sup>. Ciò indusse i ricercatori a mettere in questione i criteri di inclusione per il trattamento, ovvero a domandarsi se la soglia identificata per il trattamento non fosse troppo alta, specie per la patologia in zona I. Tali questioni furono oggetto di studio nei trials STOP-ROP (*Supplemental Therapeutic Oxygen for Pre-threshold ROP*) e ETROP (*Early Treatment for ROP*).

Trenta centri parteciparono allo STOP-ROP nell'arco di 5 anni<sup>66</sup>. Obiettivo dello studio fu di determinare se la progressione verso la soglia e la conseguente necessità di trattamento potessero essere ridotte dalla supplementazione di ossigeno. Nati pretermine con ROP pre-soglia in almeno 1 occhio e letture pulsiossimetriche di saturazione <94% furono randomizzati, rispettivamente, ad ottenere saturazione di 89-94% (325 soggetti, braccio convenzionale) o ossigeno supplementare con pulsiossimetrie mirate a valori di 96-99% (324 soggetti). Il tasso di progressione a ROP soglia nel secondo gruppo (41%) non risultò statisticamente maggiore rispetto a quello del trattamento convenzionale (48%), né fu osservata alcuna riduzione significativa della percentuale di soggetti sottoposti a trattamento sottrattivo retinico. D'altra parte, nel gruppo supplementato ad alti livelli di saturazione fu osservato un aumentato rischio di eventi polmonari avversi, quali polmoniti e patologie polmonari croniche.

Ventisei centri parteciparono all'ETROP, che fu disegnato per identificare se alcuni occhi con ROP di gravità sotto la soglia potessero beneficiare o meno del trattamento<sup>19</sup>. La ROP pre-soglia fu definita come:

- Zona I, qualsiasi ROP meno che soglia;
- Zona II, ROP 2 con plus e ROP 3 senza plus
- ROP 3 con plus ma meno che soglia.

Lo studio impiegò un modello di rischio (RM-ROP2) allo scopo di predire la probabilità di occhi pre-soglia di progredire a distacco retinico. Impiegando tale algoritmo, lo studio calcolò che l'8% di neonati con peso alla nascita <1251 g avrebbero avuto necessità di trattamento, con un incremento rispetto al 6% stimato usando le linee-guida convenzionali per il trattamento a soglia. Gli occhi riscontrati a livello di rischio >15% furono designati come occhi "pre-soglia ad alto rischio". Furono quindi randomizzati nel gruppo "early treatment" o in quello convenzionale (trattamento a ROP soglia). Il trattamento fu, come per il vecchio CRYO-ROP, l'ablazione retinica periferica totale. Su 499 occhi arruolati con ROP ad alto rischio di progressione a soglia, 401 parteciparono al trial randomizzato. Esaminatori *masked* valutarono l'*outcome* primario (acuità visiva di griglia) mediante le Teller Cards. Gli *outcomes* strutturali furono determinati a 6 e 9 mesi. Gli outcome strutturali sfavorevoli si ridussero da 15.6% a 9.0% nel gruppo *early*. Gli *outcomes* visivi sfavorevoli mostrarono una riduzione dal 19.5% al 14.5%.

Furono descritti alcuni effetti collaterali indesiderati del trattamento più precoce, con complicazioni sistemiche (apnea, bradicardia) più frequenti rispetto al trattamento convenzionale, il che fu attribuito alla più bassa età al trattamento. Le complicazioni oculari risultarono simili nei due gruppi. L'effetto potenzialmente deleterio del trattamento precoce sul campo visivo non fu determinato; tuttavia, gli Autori accettarono la possibilità che il trattamento in zona I potesse esitare in una perdita di campo visivo maggiore rispetto al trattamento in zona II.

Sia la crioterapia retinica che la fotocoagulazione laser hanno dimostrato di essere metodi efficaci di trattamento della ROP attiva. Esse vengono impiegate per a-

blare (sottrarre) la retina avascolare localizzata anteriormente alla cresta fibrovascolare. La crio era l'unica possibilità di trattamento quando non esistevano laser portatili. Essa richiede di solito una anestesia generale, oppure una sedazione con ventilazione assistita. E' necessario aprire la congiuntiva per accedere alla zona I con la criosonda. Fra le complicanze sono da menzionare: edema palpebrale, lacerazioni ed emorragie congiuntivali, emorragie preretiniche e vitreali.

Negli ultimi 10 anni la fotocoagulazione tramite laser indiretto portatile ha soppiantato la crioterapia come trattamento standard della ROP soglia. Essa può venir effettuata sia in anestesia generale, sia con intubazione e sedazione, o con blocco sotto-tenoniano. Essa è più comoda e tecnicamente semplice da eseguire rispetto alla crio ed è particolarmente vantaggiosa nel trattamento delle forme posteriori. Permette un trattamento preciso e relativamente meno traumatico, con minori effetti indesiderati sia oculari che sistemici. Consente di evitare lesioni alla superficie oculare ed alla sclera. Le complicanze riportate comprendono: ustioni corneali, iridee e del cristallino; ipoema, emorragie vitreali e rotture di coroide. Una sorgente laser a diodo rosso (che emette a 810 nm) è preferibile rispetto all'Argon verde (514 nm) perché riduce il rischio di formazione di cataratta. La *tunica vasculosa lentis*, infatti, assorbe l'energia del laser ad Argon, il che può esitare nello sviluppo di una opacità del cristallino; ciò è meno probabile con il laser a diodo.

Il confronto fra laser e crioterapia a 3 e 10 anni dopo trattamento della ROP soglia ha suggerito che gli outcome sia strutturali che visivi degli occhi laser-trattati siano migliori di quelli sottoposti a crioterapia<sup>67,68</sup>. Secondo entrambi questi studi, la crio era associata volte più frequentemente a dragging retinico rispetto al laser. Gli occhi trattati con il laser possedevano una BCVA (*Best-Corrected Visual acuity*, acuità visiva con miglior correzione) media di 20/66 (3/10) rispetto a 20/182 (1,6/10) degli occhi criotrattati. Gli occhi trattati con il laser, oltre, presentavano un vantaggio in termini refrattivi, essendo significativamente meno miopizzati rispetto a quelli criotrattati. Confrontando gli occhi di pazienti sottoposti in modo randomizzato a laser in un occhio e a crio nell'altro, risultò che lo sferoequivalente medio degli occhi laser era significativamente meno miopico degli occhi criotrattati.

Uno studio retrospettivo non randomizzato controllato ha dimostrato che un pattern denso di laser-fotocoagulazione (649 spots per ROP in zona II e 1253 per ROP in zona I) era più efficace rispetto ad uno meno denso (457 e 592 spots, rispettivamente) nel ridurre la progressione della malattia<sup>69</sup>. All'epoca fu postulato che una più completa ablazione della retina periferica, avascolare ed ipossica, fosse maggiormente efficace nel ridurre i fattori angiogenici. Fu pertanto raccomandata l'esecuzione di trattamenti semi-confluenti al fine di minimizzare il tasso di progressione della ROP soglia e così di ridurre l'incidenza di ritrattamenti<sup>70</sup>. Il numero di spots laser applicati rappresenta una utile guida per valutare l'entità del trattamento, ma il parametro più significativo è il raggiungimento di una adeguata copertura delle aree avascolari. Non c'è correlazione diretta fra area trattata e numero di spots, dato che le dimensioni di questi ultimi variano in relazione alla distanza della lente asferica dall'occhio, al suo potere diottrico, oltre che all'intensità ed alla durata degli spots.

Spots applicati ad una distanza di circa 0.25 diametri di spot uno dall'altro si espandono fino a produrre un pattern semi-confluente. La necessità di un ritrattamento può verificarsi in occhi con plus persistente, ROP 3 attiva, creste molto rilevate sul piano retinico o distacchi retinici trazionali localizzati; in tali casi, la fotocoagulazione laser posteriore alla cresta (se condotta con laser a diodo rosso) può essere utile. Sono state riportati casi di ischemia del segmento anteriore e tisi bulbare dopo trattamenti laser confluenti e dopo crioterapia per ROP soglia<sup>71</sup>. Per ridurre il rischio di ischemia del segmento anteriore (causata dalla ablazione delle arterie ciliari lunghe) è stato suggerito di lasciare uno spazio maggiore fra gli spots (laser o crio) piuttosto che cercare a tutti i costi di ottenere un pattern confluyente, nei quadranti orari localizzati sul meridiano orizzontale.

Alcuni bambini sviluppano un distacco retinico nonostante l'esecuzione di trattamenti tempestivi e completi, con risultati anatomici scadenti e prognosi visiva infausta. Il rischio di progressione a ROP 4 può essere predetto dalla presenza di *haze* vitreale persistente, cresta sollevata per 6 o più quadranti orari e dalla presenza di plus in due o più quadranti; la neovascolarizzazione extraretinica, al contrario, non rappresenta un elemento predittivo per distacco retinico. Nonostante siano stati de-

scritti diversi approcci chirurgici al distacco, non esistono dati derivanti da alcuno studio randomizzato prospettico in grado di orientare la gestione di tali casi<sup>72</sup>. Fra le varie opzioni chirurgiche descritte, ricordiamo il cerchiaggio sclerale, la vitrectomia con o senza lensectomia (LSV, *lens-sparing vitrectomy*), associata o meno a cerchiaggio.

Le trazioni vitreoretiniche tendono ad iniziare nell'area della cresta fibrovascolare extraretinica ed ad estendersi sia circonferenzialmente che in senso postero-anteriore. Gli interventi di cerchiaggio non trattano direttamente in modo adeguato le forze trazionali vitreoretiniche e richiedono una procedura secondaria per rimuovere il cerchiaggio al fine di consentire un più normale sviluppo dimensionale del bulbo. I cerchiaggi monolaterali inducono inoltre una importante miopizzazione con ambliopia anisometropica conseguente. La vitrectomia lens-sparing, interrompendo tali moduli di forza trazionale può essere in grado di arrestare la tendenza al distacco retinico trazionale. Il tasso di successo anatomico della LSV può raggiungere il 90% rispetto al 60-75% riportato per il cerchiaggio<sup>73-75</sup>.

Complicanze potenziali della LSV sono l'endoftalmite (peraltro non riportata), rotture retiniche iatrogene, cataratta e glaucoma. La formazione di cataratta è peraltro rara dopo chirurgia vitreoretinica pediatrica (5-15% dopo LSV). Nonostante il successo anatomico, i risultati visivi continuano comunque ad essere scadenti.

I risultati visivi della LSV sembrano incoraggianti, ma sono variabili. Viene inoltre studiata l'opportunità di un intervento ancor più precoce, da attuarsi prima che si distacchi la retina, cioè nei casi di ROP che si mostrino refrattari al trattamento ablativo e mostrino tendenza evolutiva a dispetto del trattamento confluyente delle zone ischemiche (*early vitrectomy*). La vitrectomia avrebbe infatti la finalità di rimuovere quei fattori angiogenetici responsabili dell'evoluzione inesorabile della malattia verso la proliferazione fibrovascolare e verso il distacco di retina. Tale approccio è alla base del trial BEAT-ROP in attuale definizione. L'intervento di vitrectomia al 5 stadio, visti gli scarsi esiti funzionali, è stato invece abbandonato.

## COMMENTO

La storia dell'approccio al trattamento della ROP acuta può offrire i seguenti elementi di analisi:

1. La ROP non dovrebbe mai diventare una patologia chirurgica: quando ciò si verifica, la storia naturale della malattia è progredita tanto da impedire, o comunque limitare significativamente, la possibilità di un ripristino funzionale utile per una normale vita di relazione e per un corretto sviluppo neuropsico sensoriale. Le alterazioni anatomo-patologiche che intervengono negli stadi soglia (ma, in verità assai spesso anche nelle forme pre-soglia sono sostanzialmente irreversibili e qualsiasi approccio terapeutico è, di fatto, limitato al tentativo di impedire la perdita totale della percezione visiva e/o del bulbo.
2. Gli unici due RCT disponibili (CRYO-ROP ed ETROP) hanno ridotto l'incidenza di cecità ed ipovisione (visus massimo inferiore a 3/10) dall'88% dei non trattati, al 70% del CRYO-ROP, al 35% dell'ETROP. In altri termini, nella popolazione dei prematuri a rischio, più di un neonato su tre risulta ancora disabile visivo per esiti di retinopatia del pretermine.
3. La fragilità del piccolo paziente prematuro impone di adottare approcci il meno invasivi ed il più conservativi possibile. Ad oggi, nessun trattamento convenzionale (ablazione retinica periferica totale, comunque realizzata, rispetta tali due condizioni.

Alla luce di tali considerazioni, riteniamo, come altri Autori, che si debba tentare una correzione di rotta decisa, verso una terapia di questa particolarissima forma patologica che sia causale (e non meramente sintomatica), temporalmente appropriata ed in grado di prevenire le alterazioni irreversibili della ROP evolutiva.

In tale direzione sembrano andare alcune delle più recenti esperienze comparse in letteratura negli ultimi 18 mesi, in parallelo con l'avanzamento dello studio da noi condotto.





## 5 – Obiettivi dello studio

---

Scopo del presente lavoro è valutare l'efficacia a breve termine del trattamento con anticorpi monoclonali anti-VEGF somministrati per iniezione intravitreale a neonati pretermine affetti da ROP grave evolutiva, associato o meno a procedure di fotoblazione retinica segmentale mediante laser a Argon verde. A tale scopo vengono riportati i dati di una serie di casi retrospettiva, consecutiva, non comparativa di ROP 3 moderata/grave in zona I o zona II posteriore trattati, sulla base delle conoscenze fisiopatologiche e sulla scorta dei dati derivati da precedenti studi, mediante iniezione intra-vitreale di bevacizumab e/o trattamento laser Argon segmentale sulle aree ischemiche posteriori ed avascolari anteriori alla demarcazione, ove identificabile.

Per gli scopi dello studio sono stati ricercati e determinati, sia oftalmoscopicamente, che mediante retinografia digitale:

- l'arresto della neoangiogenesi patologica;
- l'arresto della proliferazione fibrovascolare extraretinica, ove presente;
- la ripresa e la progressione a termine di un normale pattern di vascolarizzazione retinica periferica.

Sono stati ricercati, registrati e valutati registrati gli effetti avversi e le complicanze (immediati e a breve termine), sia locali (mediante esame obiettivo oftalmologico esterno, oftalmoscopia binoculare indiretta, retinografia digitale) e sistemiche (mediante esame obiettivo neonatologico esterno e registrazione dei parametri vitali).

## 6 – Materiali e metodi

---

Descriviamo una serie di casi retrospettiva, consecutiva, non controllata, di 10 occhi di 5 pazienti, affetti da ROP tipo I ad alto rischio (ROP in zona I, in zona II posteriore, AP-ROP) trattati con una singola iniezione intravitreale di bevacizumab in ciascun occhio. In 6 occhi, l'iniezione della molecola anti-VEGF (0.50 mg, pari a 0.02 ml) ha seguito un precedente trattamento laser segmentale. La presente serie di casi comprende 5 pazienti (*Tab. 6-I*), 3 maschi e 2 femmine, tutti di razza caucasica, tutti nati da gravidanze monocoriali. Tre dei 5 pazienti sono stati affetti da sepsi biologicamente confermata. Uno era affetto da ipertensione endocranica secondaria ad emorragia intraventricolare cerebrale di grado IV e presenta attualmente paralisi coniugata dello sguardo in alto. Due hanno ricevuto trattamento farmacologico sistemico con ibuprofen intravenoso per dotto arterioso pervio con risoluzione. Il peso medio alla nascita era di 618 g, con una età post-mestruale media di 24,3 settimane alla nascita.

Tre dei cinque pazienti erano ricoverati presso la TIN dell'Azienda Ospedaliero - Universitaria Careggi di Firenze, mentre due provenivano dalla TIN dell'Azienda Ospedaliero - Universitaria Meyer di Firenze.

Ai genitori di tutti i pazienti è stato prospettato sia la possibilità dell'approccio laser mini-invasivo, sia quella della terapia *off-label* anti-VEGF intravitreale, con ottenimento di consenso informato da entrambi i genitori in tutti i casi.

I cinque neonati, di peso alla nascita compreso fra 530 e 710 g (media 618 g) ed età gestazionali postmestruali (EPM) alla nascita comprese fra 23,4 e 25,5 settimane (media 24,3 settimane) sono stati trattati mediante una singola iniezione intravitreale di bevacizumab [0,50 mg (0,02 ml)] ad età postmestruali comprese fra 33 e 37,3 settimane (media 34 settimane); in tre casi il trattamento ha seguito (a distanza di 3-7 giorni, media 4 giorni) un precedente trattamento con fotoablazione laser segmentale mediante Argon laser su caschetto per oftalmoscopia binoculare indiretta (Alcon® 532 Ophthalas® Eyelite®, Alcon Labs, Fort Worth, TX), condotto ad età postmestruali comprese fra 33 e 36,3 settimane (media 34,7 settimane) con applicazione di 120-400 spots non confluenti sulle aree oftalmoscopicamente caratterizzate da attività vascolare patologica maggiore. Nei due casi restanti non è mai stato applicato laser. Il

follow-up post-trattamento con bevacizumab (primario o consecutivo) è compreso fra 28 e 48 settimane (media 37,6 settimane). Immagini digitali ottenute mediante RetCam (Clarity Medical Systems, Pleasanton, CA) sono state ottenute in tutti i casi per documentare l'aspetto pre-trattamento e per monitorarne i cambiamenti nel tempo.

## LOCALIZZAZIONE E STADIAZIONE

Sono stati seguiti i criteri classificativi e di determinazione della gravità della ROP previsti dalla ICROP revisionata<sup>56</sup>.

Sono stati considerati arruolabili nel presente studio solo pazienti con ROP 3 moderata o severa in zona I o zona II posteriore, comprendenti anche forme di ROP aggressiva posteriore (tipicamente senza proliferazione fibrovascolare extraretinica alla diagnosi, ma rapidamente evolventi a ROP 5 se non trattate). Nessun paziente affetto da anomalie congenite sistemiche o oculari è stato inserito in questo studio. Un paziente era affetto da idrocefalo secondario ad emorragia ventricolare.

Lo screening è stato effettuato in accordo con i criteri previsti dalle raccomandazioni AAO-AAP-AAPOS 2006<sup>62</sup>.

Un paziente è stato riferito da altra sede e trattato dopo osservazione di 4 giorni. Tutti gli altri casi sono stati tenuti sotto osservazione ogni 3-4 giorni dopo la diagnosi, allo scopo di minimizzare il numero di casi trattati che avrebbero potuto subire una regressione spontanea.

La presenza di *plus disease* è stata considerata tale anche di fronte a quadri di pre-plus marcato, anche se limitato a pochi quadranti orari (tipicamente, quelli in rapporto topografico diretto con le branche vascolari maggiori).

Complessivamente, la tempistica del trattamento è risultata leggermente più precoce di quanto raccomandato nello studio ETROP<sup>19</sup> per le forme di tipo I e decisamente più precoce di quanto stabilito nel CRYO-ROP (presenza di *plus disease* evidente)<sup>14,15,65</sup>.

Pz.	ID	Sesso	Zona	Stadio	AP-ROP	TVL	Peso nascita (g)	EPM nascita	EPM al laser		EPM all'iniezione		Combi	Follow-up	PDA	IVH	SEPSI
									OD	OS	OD	OS					
1	SL	M	1	AP-ROP	SI	SI	530	23,4	33	33,8	33	33,8	SI	48	NO	SI	SI
2	RS	F	1	3+	NO	SI	670	24,4	34,3	35,3	34,3	35,3	SI	42	NO	NO	SI
3	PG	M	2post	AP-ROP	SI	SI	600	24,3	-	-	33,3	-	NO	30	SI	NO	NO
4	FL	M	2post	3+	NO	SI	710	25,5	36,3	36,3	-	37,3	NO	40	SI	NO	NO
5	GE	F	1	3+	NO	SI	580	24,2	35,5	35,5	35,5	-	SI	28	NO	NO	NO
<b>Media</b>							<b>618</b>	<b>24,3</b>	<b>34,7</b>	<b>35,2</b>	<b>34,0</b>	<b>35,4</b>		<b>37,6</b>			

AP-ROP: ROP aggressiva posteriore; TVL: *tunica vasculosa lentis*; EPM: età post-mestruale, settimane; Combi: trattamento combinato laser+intravitreale nella stessa seduta; PDA: dotto arterioso pervio; IVH: emorragia intraventricolare; Follow-up (sett.): settimane di controllo disponibile dall'ultimo trattamento eseguito

*Tab. 6-I: Dati dei pazienti trattati con iniezione intravitreale di bevacizumab e/o laserterapia segmentale per il trattamento di ROP 3 moderata/grave in zona I o zona II posteriore*

Tutti i casi sono stati documentati preoperatoriamente e strettamente seguiti nel follow-up mediante oftalmoscopia binoculare indiretta e/o RetCam II (Clarity Medical Systems, Pleasanton, CA), per stadiare la malattia, per determinare la presenza di eventuali recidive dopo iniezione intravitreale o per stabilirne l'opportunità dopo trattamento laser segmentale; in un solo caso (caso 1), la documentazione preoperatoria è rappresentata da fotogrammi di riprese video eseguite mediante oftalmoscopia binoculare indiretto accoppiato a sistema di videoregistrazione. Non sono state osservate recidive in alcun caso; in tre casi di laserterapia segmentale è stata posta indicazione a terapia anti-VEGF sulla base della documentazione oftalmoscopica di una mancata disattivazione vascolare.

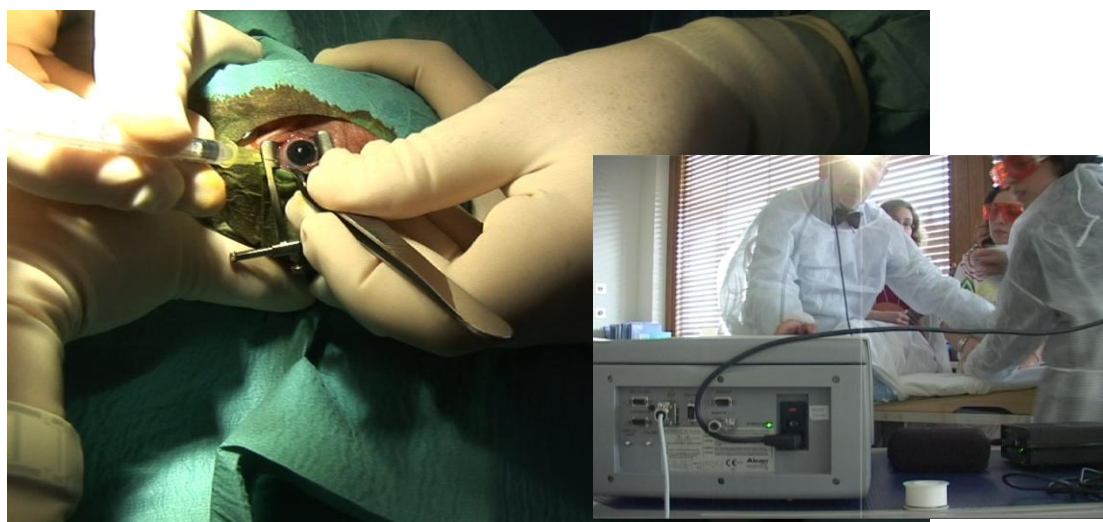
## TRATTAMENTI

Le iniezioni ed i trattamenti laser sono stati effettuati sotto monitoraggio cardio-respiratorio continuo; i neonati sono stati trattati per sedazione cosciente mediante iniezione intravenosa di midazolam e con instillazione topica di ossibuprocaina cloridrato soluzione oftalmica monodose. Il bevacizumab è stato fornito dalla farmacia interna dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi di Firenze in singole dosi sterili

di 0,50 mg (0,02 ml) in siringhe monouso con ago 30-gauge, conservate in contenitori opachi in frigorifero a 4°C in attesa dell'iniezione.

Lo strumentario (sterile) comprendeva: guanti sterili per operatore ed assistenti, blefarostato neonatale, pinza tipo Bietti, indentatore sclerale (stuello in cotone), telino chirurgico oftalmico adesivo.

Una goccia di povidone iodato 5% soluzione è stata applicata nel fornice congiuntivale per 60" e successivamente lavata con BSS sterile. L'occhio è stato stabilizzato in tutti i casi di iniezione con la pinza e nei casi trattati con laser mediante lo stuello/indentatore. Le iniezioni sono state eseguite nasalmente. L'ago è stato diretto prima sub-coronalmente (nel tratto immediatamente intrasclerale), poi posteriormente, verso il nervo ottico, ottenendo così uno pseudo-tunnel sclerale a tenuta, penetrando la congiuntiva e la sclera 1,5 mm posteriormente al limbus, evitando il cristallino, per un tragitto pari a circa 2/3 della sua lunghezza, con svuotamento intravitreale completo della siringa (*Fig. 6.1*). Al termine dell'iniezione è stato nuovamente applicato povidone iodato 5% soluzione e l'occhio è stato medicato con netilmicina soluzione oftalmica monodose, 2 gocce, seguita da bendaggio occlusivo per 12 ore (*Fig. 6.2*). E' stata eseguita oftalmoscopia di controllo per



*Fig. 6.1: Trattamenti: iniezione intravitreale; nell'inserto, trattamento laser*



escludere emorragie vitreali od altre complicanze (lesioni del cristallino, rotture retiniche), oltre che per verificare la presenza del polso in a. centrale retinica. E' stato infine rimosso il blefarostato ed eseguita valutazione digitale trans-palpebrale della tensione intraoculare. La medicazione antibiotica, in ragione di 4 somministrazioni al giorno, è stata proseguita per i successivi 7 giorni.

Una oftalmoscopia di controllo, associata ad esame Ret-Cam, è stata eseguita a 24 ore di distanza per escludere eventuali segni di endoftalmite.

Nessuna delle complicanze ricercate è stata riscontrata né nei casi sottoposti a sola iniezione intravitreale, né nei casi precedentemente trattati con laser.

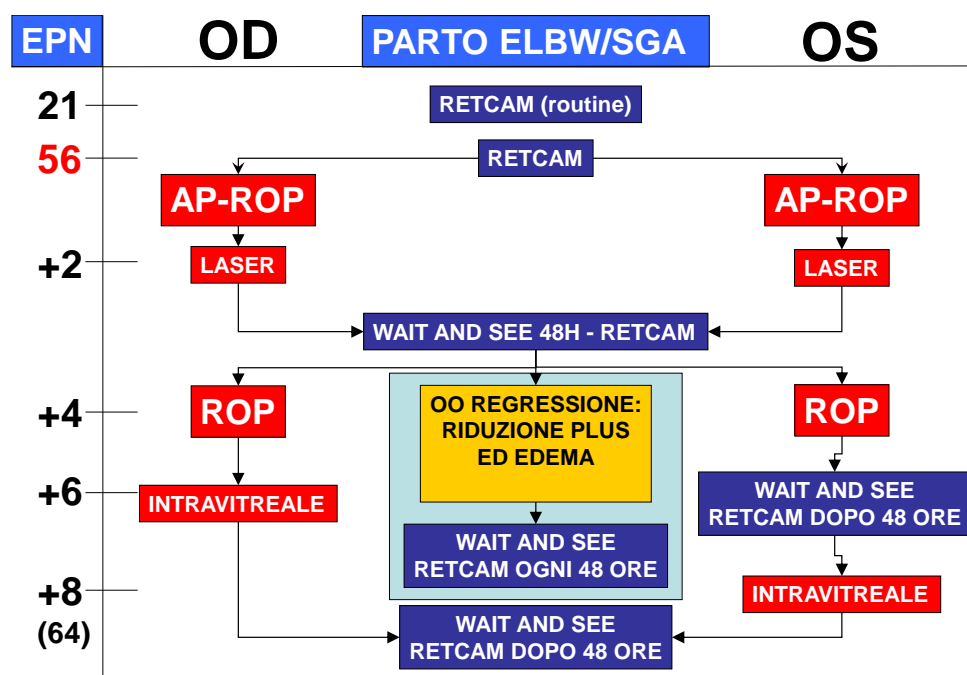
Il medesimo protocollo di preparazione del campo, antisettico e di controllo postoperatorio era stato precedentemente applicato nei casi trattati con laser, salvo che la medicazione antibiotica postoperatoria, alla stessa posologia, è stata proseguita per 3 giorni.



*Fig. 6.2: Medicazione postoperatoria*

I trattamenti laser (*Fig. 6.1-inserito*) sono stati eseguiti mediante laser ad Argon (all'epoca disponibile) su caschetto per oftalmoscopia binoculare indiretta (Alcon® 532 Ophthalas® Eyelite®, Alcon Labs, Fort Worth, TX), con il medesimo protocollo anestesiológico impiegato per le iniezioni. Il laser è stato settato su valori di potenza compresi fra 180 e 280 mW, con durata di 100 ms, con applicazione di 120-400 spots

non confluenti sulle aree oftalmoscopicamente caratterizzate da attività vascolare patologica maggiore. La tempistica dei trattamenti laser e delle iniezioni intravitreali è schematizzata in *Tab. 6-II*. In nessun caso l'iniezione intravitreale è stata eseguita bilateralmente nella stessa seduta, ma è stato sempre rispettato l'intervallo di 3 giorni richiesto dal controllo di eventuali fatti infettivi endovitreali.



EPN: età postnatale (settimane); ELBW: extremely low birth weight; SGA: small for gestational age; wait and see: monitoraggio

*Tab. 6-II. Protocollo dei tempi per i trattamenti laser e anti-VEGF intravitreali (quando associati) impiegato nel trattamento di ROP 3 moderata/grave in zona I o zona II posteriore*

## 7 – Risultati

---

Tutti i 4 occhi sottoposti ad iniezione intravitreale sono stati trattati senza che si verificassero *outcomes* strutturali sfavorevoli (distacco retinico, ectopia maculare, miopia elevata, anisometropia superiore alle 1,50 D o altre anomalie). I sei occhi trattati con laser sono stati trattati senza che si verificassero outcome strutturali sfavorevoli; in due occhi si sono osservate distorsioni pupillari conseguenti ad impatti laser. In nessun caso sono state evidenziate complicanze locali o sistemiche.

All'ultima visita di follow-up disponibile non sono state evidenziate evoluzioni negative del quadro retinico.

Tutti i casi sono stati trattati mediante una sola seduta laser per occhio (in 3 dei 5 casi) ed una sola iniezione intravitreale (5 dei 5 casi). In 2 casi l'iniezione è stata bilaterale, in due monolaterale, uno dei quali come prima scelta (caso 4).

In tutti i casi, dopo l'iniezione intravitreale, si è assistito ad una riduzione della congestione iridea e della rigidità pupillare, regressione della *tunica vasculosa lentis*, immediata e significativa riduzione dei segni di attività vascolare su tutto l'ambito retinico vascolarizzato. Una sostanziale estinzione della malattia acuta si è osservata in tutti i casi. V. in calce a questa sezione per le immagini e le descrizioni di tre casi (casi 1, 3 e 4), il primo ed il secondo sottoposti a trattamento combinato, il terzo trattato con solo bevacizumab.

Nei casi trattati con laser, questo è stato effettuato sempre simultaneamente all'iniezione intravitreale, eseguendo questa al termine della procedura laser. In un solo caso trattato con laser ed iniezione (caso 3), l'iniezione non è stata eseguita nella stessa seduta, ma a distanza di una settimana.

Nei casi bilaterali, la procedura combinata (eseguita in 3 casi su 3) è stata condotta a distanza di una settimana dal primo occhio trattato, per cautela verso il possibile problema infettivo.

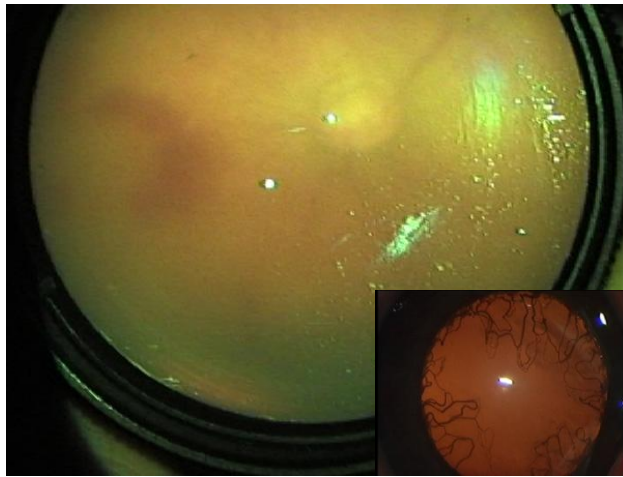
Nel follow-up disponibile per ciascun paziente (durata media 37,6 settimane: range, 28-48 settimane dall'ultimo trattamento eseguito), le visite oculistiche eseguite hanno dimostrato, in 4 casi su 5, una fissazione centrale stabile con assenza di tropie manifeste. In un caso (caso 1) è presente, come detto, un disordine dello sguardo,

probabilmente associato a deficit visivo di origine centrale, correlato con il danno da IVH e ipossico-ischemico subito dal sistema nervoso centrale del bambino, in particolare a carico delle vie ottiche retro chiasmatiche genicolate ed extra-genicolate.

I mezzi diottrici (cornea, cristallino, vitreo) sono trasparenti in 9 occhi su 10; in un caso (caso 1) si è osservata la formazione di lieve opacità periferica corticale del cristallino dell'OS. non è risultata anisometropia superiore alle 1.5 diottrie; in nessun caso è stato finora evidenziata una refrazione a sferoequivalente negativo.

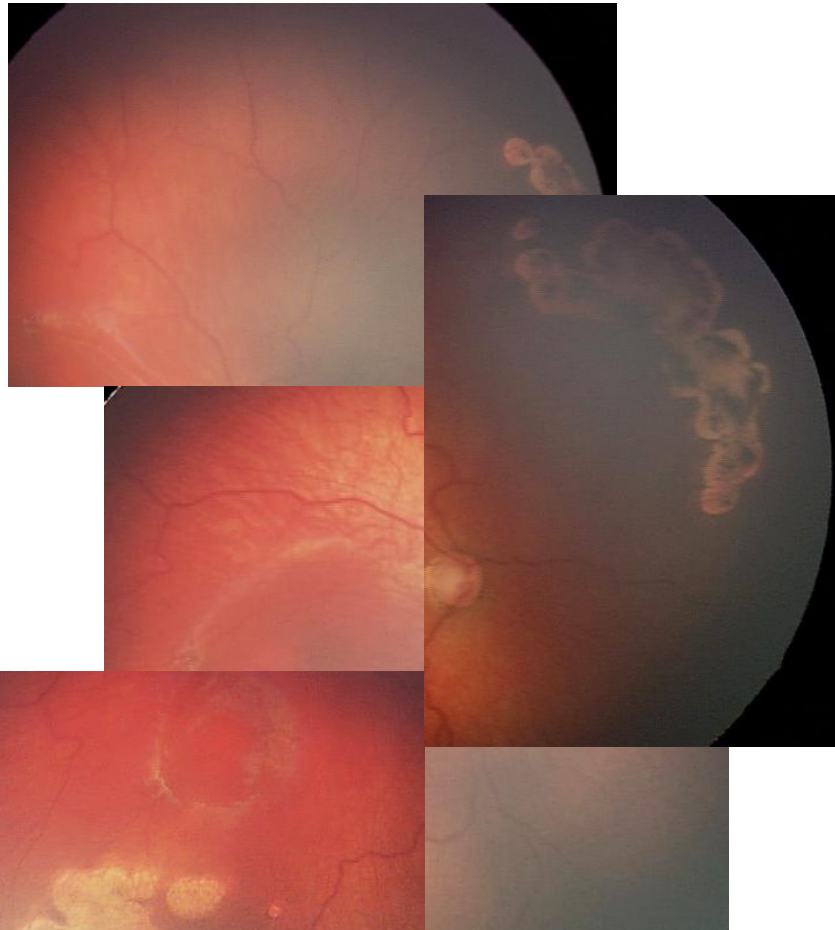
In nessun caso si sono verificati eventi infettivi (in particolare intravitreali), né traumatismi del cristallino. In due casi (caso 1 e caso 3) si sono verificate lievi lesioni da laser a livello irideo, con riduzione sia della midriasi che della miosi massimale, nei tre occhi complessivamente trattati. Negli altri casi, la midriasi farmacologica è risultata massimale.

Tutti i cinque pazienti presentavano problemi neurologici di diversa entità, prevalentemente connessi con la estrema prematurità (nessuno presentava età gestazionale alla nascita superiori alle 25,5 settimane, ed il peso alla nascita non superava i 700 g in 4 su 5), precedentemente all'iniezione intravitreale; per tale ragione, eventuali effetti sistemici neurologici risulterebbero difficili da identificare in questa serie; tuttavia, i pazienti verranno seguiti fino al termine della prima infanzia e sono già stati tutti presi in carico da servizi di neuropsichiatria infantile e di terapia della neuropsicomotricità dell'età evolutiva. Nei pazienti con deficit neurologici più sfumati speriamo di poter in futuro determinare la presenza/assenza di effetti additivi negativi a distanza conseguenti al trattamento anti-VEGF. In nessun caso sono stati comunque registrati fenomeni trombotici sistemici, ipertensione, emorragie gastro-intestinali dopo le iniezioni intravitreali di bevacizumab.



*Fig. 7.1.a: Caso 1. OD.*  
EG 32+5, EPN 9

RETCAM non disponibile. Oftalmoscopia binoculare indiretta: scarsa midriasi per rigidità pupillare associata a vasi iridei persistenti e mediamente turgidi; turgore tunica vasculosa lentis (TVL) anteriore (Inserto), residuo a. ialoidea, haze vitreale. Quadro di AP-ROP in zona I con turgore venoso e tortuosità arteriolare severi; topografia vascolare totalmente sovvertita al polo posteriore; laccatura ematica epiretinica. Edema sottoretinico diffuso. Trattamento: laser segmentale + bevacizumab simultaneo



*Fig. 7.1.b. Caso 1. OD.*  
EG 57, EPN 35

Midriasi completa, iride decongesta; cristallino trasparente; vitreo silente; Papilla normocromica, normoconformata. Iper-riflettenza della ialoide posteriore. Regione maculare nei limiti. Normale topografia dell'albero vascolare retinico. Progressione vascolare a termine. Edema assente. Immagine assemblata.



**Fig. 7.2.a: Caso 3. OD.**

**EG 31+2, EPN 7**

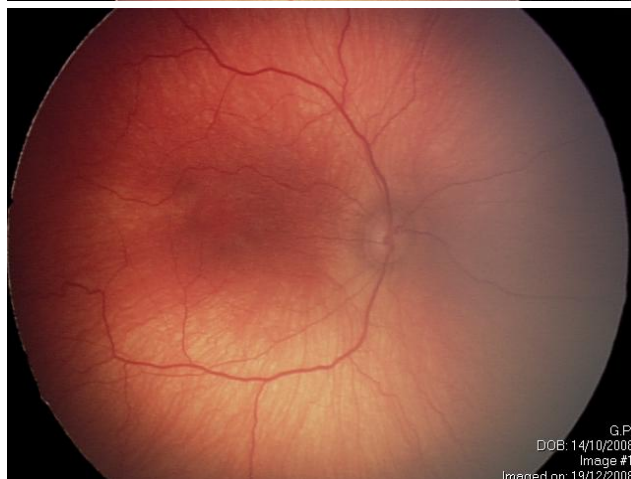
Midriasi incompleta, iride non congesta; tenui residui TVL; haze vitreale; crescita vascolare confinata alla zona II posteriore. Vasi arteriosi sottili, rigidi, terminanti a coda di topo.



**Fig. 7.2.b: Caso 3. OD.**

**EG 33+2, EPN 9**

Midriasi incompleta, iride congesta; imponenti residui TVL; haze vitreale. Presenza di marcata tortuosità vascolare, turgore venoso, shunt artero-venoso diffuso tipo sincizio: assenza di demarcazione netta. Quadro di ROP aggressiva posteriore (flat form) in zona II posteriore. Occhio trattato entro 12 ore dalla diagnosi mediante iniezione intravitreale di bevacizumab 0.50 mg

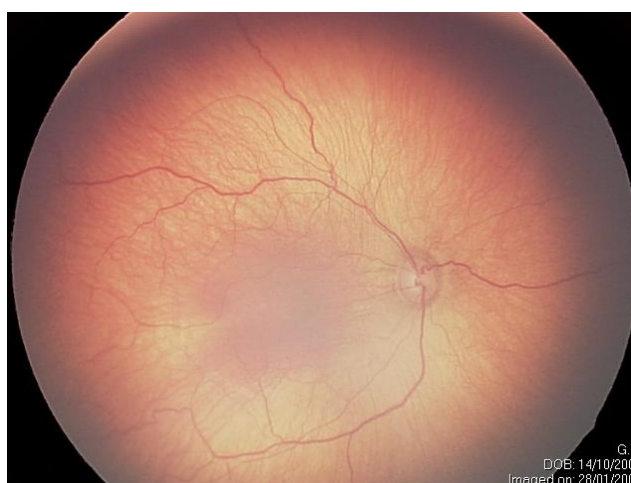


**Fig. 7.2.c: Caso 3. OD.**

**EG 33+4, EPN 9+2**

**36 ore dopo il trattamento**

Midriasi completa, iride decongesta; TVL completamente riassorbita; vitreo silente; quadro vascolare silente. ROP acuta in risoluzione. Papilla normocromica, normoplasica.

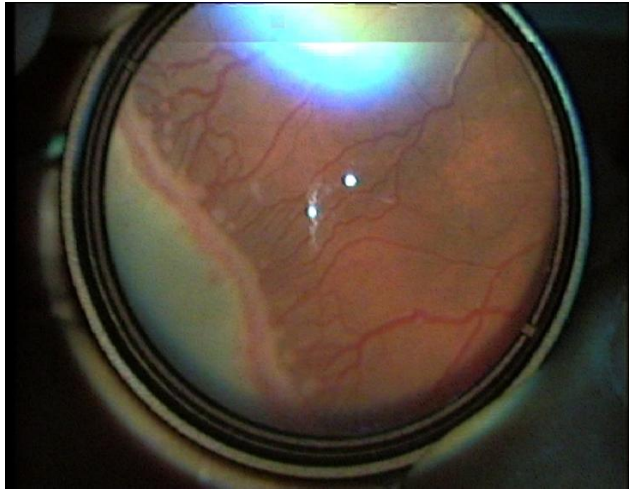


**Fig. 7.2.d: Caso 3. OD.**

**EG 38+6, EPN 14+4**

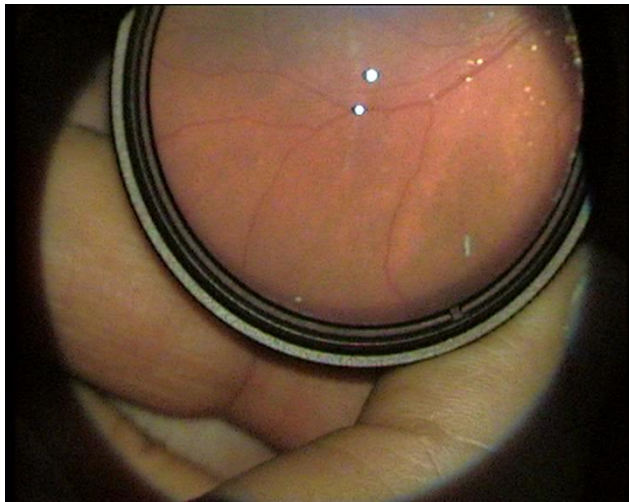
ROP risolta. Normovascolarizzazione retinica, apparentemente come a termine di gravidanza.





*Fig. 7.3.a: Caso 4. OS.*  
EG 37+4, EPN 11+6

Residui TVL. ROP 3 con pre-plus in zona 2 posteriore.



*Fig. 7.3.b: Caso 4. OS.*  
EG 42+4, EPN 17+6

Regressionione della TVL, del pre-plus e della PVR. Periferia normovascolarizzata su 360°.



## 8 – Discussione

---

Il ruolo del VEGF nella patogenesi della ROP (è stato prima ipotizzato e poi dimostrato<sup>37,76</sup>. Esistono prove derivanti da studi clinici prospettici randomizzati controllati in merito all'efficacia di trattamenti destruenti della retina periferica, anteriore e posteriore alla proliferazione fibrovascolare extraretinica, finalizzati alla ablazione fisica degli elementi cellulari deputati al rilascio di VEGF. Le linee-guida derivate da tali RCTs raccomandano terapie ablative meno invasive (laser-terapia anziché crioterapia), condotte precocemente nella fase II della ROP<sup>37</sup>, con particolare enfasi riguardo ad un rigoroso processo di screening, in grado di identificare correttamente la ROP e di determinarne il momento più opportuno per il trattamento<sup>19</sup>. Esiste, tuttavia, un certo disaccordo in merito all'identificazione dei segni di *plus disease*<sup>56,77</sup>; si pensa che un certo numero di trattamenti effettuati possa non essere necessario<sup>78-81</sup>; si assiste ad una nuova tendenza, non ancora pienamente espressa nella letteratura, ma evidente nella comunità scientifica, verso trattamenti laser meno aggressivi. Infatti, la fotoblazione retinica periferica totale, condotta dal margine anteriore della demarcazione fino all'ora serrata su 360°, attualmente raccomandata in seguito ai risultati degli RCT STOP-ROP e ETROP, pur risultando efficace nel prevenire gli *outcomes* strutturali più sfavorevoli (distacco retinico, pieghe retiniche, ectopia maculare), è fortemente aggressiva verso la struttura della retina e dell'occhio, potendo anche provocare, fra l'altro, una progressiva atrofia ottica come esito della degenerazione assonale retrograda degli assoni delle cellule ganglionari periferiche fotoablate.

Per contro, risulta chiaramente stabilito che i casi di ROP in zona I (specialmente le forme di ROP aggressiva posteriore) hanno spesso outcome sfavorevoli, nonostante screening e trattamenti appropriati<sup>82-87</sup>.

In seguito allo sviluppo di molecole anti-VEGF per impiego intravenoso nel trattamento adiuvante del cancro colo-rettale metastatico (con approvazione FDA per bevacizumab nel 2004) e per il cancro polmonare metastatico (bevacizumab approvato nel 2006) ed in seguito alla loro recente introduzione nella pratica clinica per alcune forme di patologie oculari con neovascolarizzazione (segnatamente AMD, approvazione FDA 2006 per ranibizumab), si inizia a ritenere plausibile l'impiego di tali molecole per il trattamento della ROP.

Al contempo, l'osservazione di ROP acute arrestate e guarite dopo trattamenti laser non massimali e la recente introduzione della possibilità di eseguire routinariamente una angiografia retinica in pazienti pretermine ricoverati hanno contribuito ad introdurre l'ipotesi che l'applicazione di laser non tanto e non soltanto sulla retina avascolare anteriore alla demarcazione, ma anche – e selettivamente – sulle aree ischemiche posteriori alla demarcazione, possa essere sufficiente, in casi selezionati, ad arrestare l'evoluzione della ROP senza indurre quelle drastiche modificazioni anatomico-patologiche che la crioterapia prima e la laserterapia convenzionale poi hanno dimostrato di provocare, spesso peraltro fallendo lo scopo di arrestare la malattia.

Esistono altri potenziali vantaggi derivanti da un approccio mini-invasivo (considerato come iniezione intravitreale isolata – *first-line therapy* – o consecutiva a laser segmentale ridotto – *rescue therapy*) alla ROP ad alto rischio, approccio praticabile, spesso, evitando procedure anestesilogiche importanti per un organismo fragile come quello di un prematuro, il quale spesso non presenta condizioni cliniche compatibili con una sedazione profonda o con un'anestesia generale richiesta dalla laserterapia massimale; fra tal vantaggi citiamo: la riduzione (o l'assenza) di perdite del campo visivo; la possibile riduzione della tendenza alla miopia ingravescente ed alla anisometropia, derivante dal ridotto (o assente) indebolimento sclerale; la possibile ridotta tendenza all'ambliopia (anisometropica) ed allo strabismo (dato il mantenimento di una possibile maggiore fusione periferica) ed all'ambliopia strabica; la possibile riduzione (o l'assenza) di complicanze a carico del segmento anteriore (traumatismi iridei, cataratta, emorragie) e del segmento posteriore (emorragie). Inoltre, in alcuni casi la rigidità pupillare e/o l'opacità dei mezzi rendono scarsamente praticabile e rischioso un trattamento laser esteso (mentre possono talora permettere applicazioni localizzate nelle zone oftalmoscopicamente caratterizzate da segni di più intensa attività vascolare della malattia) o l'applicazione, in condizioni scarsamente controllabili ed ad alto rischio visivo data la sede posteriore, di crioterapia ab externo.

Dal punto di vista fisiopatologico, la terapia anti-VEGF presenta un vantaggio aggiuntivo rispetto alle strategie di trattamento basate sull'ablazione di aree retiniche rilascianti VEGF: esso è rappresentato dal fatto che gli anti-VEGF bloccano istanta-

neamente la neovascolarizzazione (intra- e extra-retinica) della fase II della ROP causata dal VEGF presente nel vitreo. Il laser riduce la produzione di VEGF aggiuntivo da parte della retina periferica in evoluzione (e ciò giustifica il tentativo di un approccio segmentale nelle forme relativamente meno posteriori), ma non esercita alcun effetto sul VEGF già presente nel vitreo.

La terapia anti-VEGF nella ROP, tuttavia, è gravata da dubbi. Esistono evidenti perplessità in merito alla scelta del farmaco, al suo dosaggio, la tempistica delle iniezioni, la possibilità di dover procedere ad iniezioni ripetute, la possibilità di complicanze locali (trauma, endoftalmite) e soprattutto la possibilità di effetti avversi sistemici sia a breve che a lungo termine.

Ad aprile 2009 sono presenti in letteratura 7 articoli in totale<sup>88-94</sup>, che descrivono trattamenti *first-line* o *rescue therapy* (cioè dopo fallimento della laserterapia), tutti con bevacizumab a dosaggi compresi fra 0.50 e 1.25 mg (la maggior parte 0.75 mg, 0.03 ml), per un totale di 75 occhi. Due altri lavori (che descrivono iniezioni mono- o bilaterali di bevacizumab o pegaptanib, in associazione a laser o come *first-line*) sono riportati come abstracts o comunicazioni personali e non vengono qui citati data la mancanza di rilievi in merito alla sicurezza ed all'efficacia del trattamento. Nel 2008 è inoltre iniziato il reclutamento per un trial multicentrico controllato per il trattamento della fase proliferante della ROP (BLOCK-ROP), dopo iniziale trattamento laser fallito (*rescue*); nel 2009 è iniziato il reclutamento per un altro RCT prospettico, denominato BEAT-ROP, che confronterà l'impiego di una molecola anti-VEGF somministrata per via intravitreale contro vitrectomia precoce come *first-line* in pazienti affetti da ROP in zona I e/o II.

Dei 75 occhi trattati nei lavori citati con bevacizumab, 58 hanno ricevuto solo l'iniezione intravitreale (singola, in tutti i casi); 9 sono stati trattati anche con laser (in due casi probabilmente a causa di effetti avversi del laser stesso), 8 hanno ricevuto l'iniezione al termine di intervento di vitrectomia.

In un caso (bilaterale), trattato con bevacizumab 2-3 settimane dopo applicazione di 3000 spots laser per occhio semiconfluenti, si è verificata ischemia del segmen-

to anteriore con ipotono, associata a formazione di cataratta, atrofia iridea. Tutti gli altri lavori riferiscono successo del trattamento senza complicanze sistemiche evidenziate.

I profili di efficacia e sicurezza del ranibizumab nel trattamento della degenerazione maculare essudativa hanno condotto ad ipotizzare che trattamenti VEGF-mirati possano rappresentare una valida opzione per la terapia della ROP. La concentrazione di VEGF risulta elevata nel vitreo di pazienti affetti da ROP. Da questo punto di vista, la ROP sembra offrire una finestra terapeutica unica, con la possibilità che una singola iniezione intravitreale di un anticorpo monoclonale anti-VEGF riduca la necessità di trattamenti laser deostruenti.

In tema di dose efficace, un semplice calcolo può essere utile nel rammentare la necessità di un'attenta valutazione della dose minima efficace. Ad esempio, la concentrazione più alta di VEGF vitreale riportata in pazienti affetti da ROP in fase vascolare attiva è pari a 3500 pg/ml di vitreo (circa 0.23 pmol). Supponendo un *binding ratio* di 1:1 fra bevacizumab e VEGF, una quantità pari a 34 ng (0.034 µg) di anticorpo neutralizzante dovrebbe essere efficace. Ciò significa che 1 µg di bevacizumab sarebbe già da 10 a 100 volte in eccesso; alcuni degli studi pubblicati riportano l'impiego di 0.5-1-1.25 mg, cioè fino a circa 12.000 volte eccesso di anticorpo. Può darsi che sia necessario impiegare anticorpo in eccesso per garantire un effetto più prolungato, ma ciò non è noto. La preoccupazione in merito alla possibilità che l'anticorpo raggiunga la circolazione sistemica può in parte essere tenuta in conto impiegandolo ad alta diluizione. Bakri et al hanno riportato che nel coniglio l'iniezione intravitreale di ranibizumab 0.5 mg non è associata a concentrazioni misurabili nel siero o nell'occhio adelfo, mentre 1.25 mg inducono concentrazioni di anticorpo di 3,3 µg/ml misurabili 8 giorni dopo l'iniezione<sup>95</sup>. Nei neonati umani sono state riportate concentrazioni sieriche di VEGF-A fino a 600 pg/ml a 32 settimane di età post-mestruale; ciò suggerisce che, almeno per breve tempo, le concentrazioni molari di bevacizumab potrebbero raggiungere valori superiori anche di 1000 volte.

Il profilo di sicurezza della terapia anti-VEGF nei neonati non è stato ancora studiato. Il VEGF è un importante fattore di crescita che sovrintende ad uno sviluppo

vascolare sequenziale ed ordinato sia nell'occhio che a livello sistemico. Non sappiamo quale effetto sulla capacità visiva o a livello sistemico possa avere il blocco della progressione vascolare retinica; occorre, tuttavia, considerare che l'obiettivo di tale approccio terapeutico è quello di prevenire la cecità. Geisen et al hanno riportato che, almeno nei ratti, il bevacizumab è preferibile al ranibizumab; il primo, infatti, può inibire il solo VEGF vitreale senza interferire con il VEGF retinico, dato che il suo maggiore peso molecolare può presumibilmente renderne più difficile la diffusione intraretinica<sup>96</sup>.

La famiglia dei aptameri anti-VEGF comprende diverse molecole, caratterizzate dalla tipologia (anticorpi monoclonali), dalla diversa affinità per le isoforme di VEGF e di suoi recettori implicati nelle diverse tappe e vie dell'angiogenesi oculare, e dal peso molecolare. In questa serie, abbiamo deliberatamente deciso di impiegare bevacizumab, aptamero non-specifico per tutte le isoforme di VEGF, caratterizzato da un peso molecolare di 149 kd, contro i 48 kd di ranibizumab (Lucentis: Genentech, Inc); tale scelta è stata motivata dal tentativo di minimizzare a priori la possibilità di complicanze sistemiche. Le caratteristiche steriche e di peso di bevacizumab rendono poco probabili, come dimostrato da Geisen nell'animale da esperimento, sia la penetrazione della molecola all'interno della retina periferica indifferenziata, sia l'attraversamento della barriera emato-retinica; solo 1/1000 della concentrazione di bevacizumab presente nel vitreo dell'occhio trattato è stato trovato nell'occhio controlaterale o nel sangue circolante. In merito a ciò, va segnalato che nei 3 casi da noi trattati monolateralmente con iniezione intravitreale, si è osservata una riduzione (ancorché molto meno marcata) dei fenomeni vascolari caratteristici della ROP posteriore anche nell'occhio non trattato, peraltro senza apprezzabili differenze in tale fenomeno fra l'occhio trattato con solo bevacizumab ed i due trattati prima con laser segmentale. L'emivita intravitreale di bevacizumab nell'adulto è pari a 5.6 giorni, quella di ranibizumab 3.2 giorni<sup>96</sup>. E' verosimile che la immaturità vitreale del pretermine possa prolungare l'emivita di molte sostanze iniettate in esso.

La scelta di un approccio mini-invasivo della terapia laser è stata dettata da tre ordini di considerazioni. In primo luogo, il tentativo di minimizzare la possibile diffu-

sione sistemica del farmaco (il cui impiego è stato preventivamente ipotizzato in tutti i casi poi effettivamente trattati). In secondo luogo, recenti acquisizioni fluorangiografiche hanno dimostrato che in molti casi di ROP non ancora oftalmoscopicamente caratterizzati da proliferazione fibrovascolare extra-retinica (uno dei cardini delle linee-guida al trattamento attualmente validate) sono presenti aree di ischemia e di esudazione extravasale intra- e sottoretinica, localizzate in prossimità del margine posteriore della demarcazione (nelle forme che la presentano) e più diffuse e disordinate nelle forme più posteriori e segnatamente nella AP-ROP. Terzo, è esperienza comune – ed anche personale – l’osservazione di importanti regressioni di ROP pre-soglia trattate con laser a livelli che dovrebbero essere considerati fortemente sotto-dosati rispetto a quanto previsto nelle linee-guida ETROP. Tali evidenze ci hanno spinto a sviluppare, ancor prima del trattamento anti-VEGF intravitreale, un approccio conservativo alla foto sottrazione laser retinica, mirato al trattamento focale delle aree ischemiche posteriori alla demarcazione e, ove necessario, alla ablazione di singoli settori orari anteriori alla cresta, soltanto in corrispondenza delle aree posteriori maggiormente attive dal punto di vista sia oftalmoscopico che fluorangiografico. Tale approccio consente trattamenti di breve durata, molto meno stressogeni per il fragile paziente pretermine, ripetibili – se necessario – a distanza di alcuni giorni, in *settings* operativi non eccessivamente pesanti dal punto di vista anestesiológico e dell’assistenza infermieristica.

Nei termini descritti, la combinazione tra fotocoagulazione laser e iniezione intravitreale di bevacizumab dimostra una possibile applicazione, ben tollerata dal piccolo paziente, capace di indurre una pronta regressione di alcune delle forme di ROP a maggior rischio strutturale e funzionale. Tuttavia, l’estrema efficacia ed il risparmio in termini di invasività chirurgica che le iniezioni intravitreali di bevacizumab hanno dimostrato di poter offrire in questa piccola serie, devono far riflettere in merito alla opportunità di proseguire in trattamenti laser comunque destruenti e lesivi della barriera ematoretinica. Il tema principale nello sviluppo di questo approccio è, al momento, il tentativo di individuare una curva dose-risposta ottimale nel singolo caso.

Un'ulteriore considerazione di ordine fisiopatologico può contribuire a meglio specificare il razionale dell'approccio con iniezione intravitreale di molecole in grado di inibire gli eccessi di azione di un potente fattore pro-angiogenico quale il VEGF. La vascolarizzazione della retina periferica del neonato (pretermine) è un processo finito. Essa procede dalla papilla verso la periferia solo fino dove è reso possibile dalla presenza di cellule gliali (segnatamente gli astrociti) presenti alla nascita e non necessariamente fino all'ora serrata (ciò non accade, spesso, neanche nel neonato a termine)<sup>97</sup>. Se si riesce ad impedire la neoangiogenesi patologica VEGF-mediata in risposta alla ipossia-ischemia della retina avascolare periferica, ripristinando una più ordinata e regolare crescita vascolare nell'ambito della retina vascolarizzata (entrambi processi VEGF-dipendenti), la fase II (proliferante) della ROP non recidiva e non provoca quelle alterazioni anatomico-patologiche, anche tardive, che caratterizzano le ROP trattate con ablazione retinica, quali distacchi di retina tardivi, che sono stati descritti anche a distanza di anni. Il bevacizumab somministrato a livello intravitreale provoca effetti rapidi e notevoli sia sulla neovascolarizzazione "piatta" intraretinica delle "*flat forms*", sia sulla componente plus (dilatazione e turgore venoso, tortuosità arteriolare, haze vitreale, ingorgo vascolare irideo e rigidità pupillare). Tutti questi segni vanno incontro ad una riduzione marcatissima entro le prime 24 ore dal trattamento ed ad una virtualmente completa risoluzione nel volgere di un paio di giorni. Abbiamo osservato anche un effetto riducente sulla proliferazione fibrovascolare extra-retinica tipica delle ROP 3, ma con andamento decisamente più lento. In ogni caso, sia che la neovascolarizzazione sia intraretinica, sia che essa abbia iniziato a dirigersi nel vitreo (in risposta al gradiente retino-vitreale di concentrazione del VEGF e seguendo l'impalcatura rappresentata dalla struttura spaziale del vitreo primitivo embrionario ancora presente), la risposta alla iniezione intravitreale di bevacizumab osservabile consiste in una regressione dei vasi patologici e nella ripresa di una progressione vascolare normale, destinata verosimilmente a completarsi nel volgere di alcune settimane. Tuttavia, dato che la velocità di crescita dei vasi normali dopo anti-VEGF è minore del normale ed i vasi possono non raggiungere l'ora serrata, non è chiaro quando possiamo definire guarita la ROP trattata. Nei casi qui descritti, non abbiamo



osservato esiti sfavorevoli a distanza di almeno 37 settimane (fino a 48, massimo follow-up disponibile).

## 9 - Conclusioni

---

Scopo del presente lavoro, nato – dal punto di vista tecnico-applicativo - dall'esperienza maturata durante gli ultimi quindici anni in seno alla attuale Struttura Operativa Dipartimentale Complessa di Oftalmologia Pediatrica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi di Firenze, in stretta collaborazione con la SOD Neonatologia della stessa Azienda e con la Terapia Intensiva dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer di Firenze, era la valutazione preliminare dell'efficacia a breve termine del trattamento con anticorpi monoclonali anti-VEGF, associato o meno a procedure di fotoablazione retinica segmentale laser, di forme di ROP grave evolutiva. Obiettivo secondario dello studio era la valutazione preliminare della sicurezza del trattamento.

## **EFFICACIA**

In questa piccola serie di pazienti trattati, sia l'iniezione intravitreale di bevacizumab, (isolata o consecutiva a trattamento laser) sia il laser (se seguito da iniezione intravitreale) si sono dimostrati efficaci nel trattare la ROP 3 in zona I o zona II e la AP-ROP.

Efficacia sul blocco della neoangiogenesi retinica: dal punto di vista quantitativo e della velocità di azione, l'iniezione intravitreale ha avuto un effetto completo e rapido in tutti gli occhi trattati.

Efficacia sul blocco della proliferazione fibrovascolare extra-retinica: in tempi tanto maggiori quanto più avanzato era lo stadio di proliferazione, l'iniezione intravitreale ha consentito una regressione completa della PVR in tutti i casi, anche tramite l'effetto adiuvante del laser.

Efficacia sulla ripresa e sulla progressione della vascolarizzazione fisiologica: in tutti i neonati trattati si è potuta documentare una vascolarizzazione periferica completa, a distanza di 10-12 settimane dal trattamento. Si tratta di tempi molto più lunghi che nel normale.

Per quanto concerne gli elementi clinicamente rilevabili, nessuna delle procedure ha avuto effetti collaterali negativi sulla salute dei prematuri trattati. Nessuna delle complicanze locali o sistemiche ricercate si è verificata nella serie qui descritta.

Riteniamo tuttavia necessario un trial clinico prospettico, randomizzato, controllato, multicentrico allo scopo di meglio studiare il profilo di sicurezza e le indicazioni a tali trattamenti conservativi.

Deve essere ricordato, anche in questa sede, che il profilo di sicurezza della terapia anti-VEGF nei neonati non è stato ancora studiato. Non sappiamo quale effetto sulla capacità visiva o a livello sistemico possa avere il blocco della progressione vascolare retinica; occorre, tuttavia, considerare che l'obiettivo di tale approccio terapeutico è quello di prevenire la cecità. E' stato riportato che, almeno nei ratti, il bevacizumab è preferibile al ranibizumab; il primo, infatti, può inibire il solo VEGF vitreale senza interferire con il VEGF retinico, dato che il suo maggiore peso molecolare può presumibilmente renderne più difficile la diffusione intraretinica<sup>96</sup>.

I risultati dell'approccio laser segmentale e/o iniezione intravitreale di bevacizumab qui riportati sembrano incoraggianti per il trattamento di forme di ROP altrimenti spesso gravate da una prognosi infausta. Lo scopo della presente descrizione è quello di sottoporre la nostra esperienza ad ulteriori commenti e valutazioni. Riteniamo che anche i nostri dati, come quelli di altre serie, possano giustificare la conduzione di uno studio multicentrico prospettico, randomizzato e controllato, che valuti la sicurezza e l'efficacia di bevacizumab intravitreale isolato in fase II precoce della ROP contro la stessa procedura accoppiata a strategie di ablazione di VEGF/retiniche diverse o modificate, rispettivamente, fra quelle oggi codificate in letteratura e nella pratica clinica, segnatamente laser a basso impatto e vitrectomia precoce.

Lo studio della letteratura degli ultimi 25 anni, l'approfondimento delle più recenti acquisizioni fisiopatologiche e la disponibilità di farmaci in grado di inibire gli

effetti del VEGF hanno guidato sia la redazione della presente tesi, sia il lavoro clinico degli ultimi anni della SOD di riferimento, per quanto attiene alla Oftalmologia Neonatale (ed alla principale patologia vascolare del neonato prematuro, rappresentata, per frequenza e gravità, dalla retinopatia della prematurità).

Dal punto di vista scientifico, abbiamo potuto trarre beneficio culturale e spunto speculativo dallo sforzo di molti Autori. Grazie al loro lavoro, ci siamo venuti formando l'opinione di essere all'alba di una nuova stagione nella terapia della ROP, caratterizzata da incoraggianti esperienze nel settore dell'inibizione della neoangiogenesi patologica. In neonati non trattabili con ridotti livelli di saturazione di O<sub>2</sub>, la terapia anti-VEGF può essere utile, ma probabilmente la dose deve essere aggiustata rispetto alle concentrazioni di VEGF vitreale e dovrebbe comunque essere impiegata solo nella fase II, oltre le 32-34 settimane. Sono attualmente in corso di arruolamento pazienti per due trials clinici randomizzati prospettici multicentrici (BLOCK-ROP e BEAT-ROP), che potranno – auspicabilmente - fornire utili informazioni e risposte alle seguenti domande: quale dose, quando, quali pazienti, quali indici di sicurezza sono attendibili?

Le attuali indicazioni al trattamento (studio ETROP) portano l'impronta dei criteri che erano alla base del primo studio multicentrico sul trattamento della ROP (lo storico RCT CRYO-ROP), volto al tentativo di ridurre le più gravi conseguenze della ROP: il distacco retinico e la cecità. I trattamenti destruenti con criosonde e laser stanno oggi per lasciare il passo a nuovi e più conservativi approcci sottrattivi delle aree ischemiche e avascolari retiniche.

Ulteriore nuove prospettive di trattamento includono la somministrazione di agenti proangiogenici (segnatamente l'IGF-1), ma solo in fase I. Tale approccio potrà essere utile anche nel trattamento di altri organi ed apparati (polmone) e potrebbe fornire nuove prospettive sulle possibilità di rimodellamento capillare di aree ischemiche, come nella retinopatia diabetica.

Infine, è da ritenersi necessario l'avvio di uno studio prospettico randomizzato sulla supplementazione di ossigeno. Nuovi e più orientati criteri diagnostici e di

screening sono supportati da evidenze scientifiche. Dovremo lavorare, insieme ai neonatologi, per sviluppare protocolli di supplementazione dell'ossigeno e di monitoraggio dei fattori di crescita epato-secreti per ridurre “alla fonte” il numero dei neonati a rischio di ROP. La ROP potrebbe presto diventare una patologia prevenibile; il più razionale approccio preventivo (una meticolosa supplementazione di ossigeno) è tuttavia difficile da implementare, in ragione sia del necessario cambiamento di mentalità e di procedure che il personale delle TIN dovrebbe raggiungere, sia del fatto che alcuni neonati necessitano comunque, per sopravvivere, di alti livelli di ossigeno, sia delle frequenti comorbidità (prime fra tutte, le sepsi).

## Ringraziamenti

---

Sono grato, per il determinante contributo reso allo sviluppo delle conoscenze sulla fisiopatologia della vascolarizzazione retinica, al mio tutor, Prof. Ugo Menchini ed ai suoi Collaboratori; per l'attenzione e la disponibilità dimostratemi, nonché per il rigoroso supporto offertomi, al Coordinatore del Corso di Dottorato, Prof. Lucio Rucci; per l'impegno comune, per gli insegnamenti ricevuti e la dedizione ai nostri piccoli Pazienti al Prof. Agostino La Torre; per la preziosa collaborazione alla Dott.ssa Pina Fortunato, alla Dott.ssa Liliana Pollazzi, al Dr. Patrizio Carratta ed agli altri Collaboratori dell'Oftalmologia Pediatrica di Careggi; per l'assidua opera resa a favore dei bambini prematuri e per il lungo lavoro comune al Prof. Firmino F. Rubaltelli, al Prof. Carlo Dani, a tutto lo staff medico ed infermieristico della Neonatologia di Careggi, oltre che al Dott. Patrizio Fiorini ed a tutto lo staff della Terapia Intensiva e Rianimazione del Meyer.



## Bibliografia

---

1. Terry TL. Extreme prematurity and fibroblastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens: I. Preliminary report. *Am J Ophthalmol* 1942;25:203-4.
2. Kinsey VE. Retrolental fibroplasia; cooperative study of retrolental fibroplasia and the use of oxygen. *AMA Arch Ophthalmol* 1956; 56:481-543.
3. Campbell K. Intensive Oxygen Therapy as a possible cause of Retrolental Fibroplasia: A Clinical Approach, *The Medical Journal of Australia*, 1951, pages 48-50
4. Crosse VM, Evans PJ. Prevention of Retrolental Fibroplasia. *A.M.A. Archives of Ophthalmology*, July 1952, 48: 83-87
5. Evans PJ. Retrolental Fibroplasia. *Transactions of the Ophthalmological Society of the United Kingdom*, 1952, 71: 613-16
6. Ashton N, Ward B, Serpell G. Role of oxygen in the genesis of retrolental fibroplasia; a preliminary report. *Br J Ophthalmol* 1953; 37:513-20.
7. Ashton N, Cook C. Direct observation of the effect of oxygen on developing vessels: preliminary report. *Br J Ophthalmol* 1954; 38:433-40.
8. Ashton N. Oxygen and the growth and development of retinal vessels. In vivo and in vitro studies. The XX Francis I. Proctor Lecture. *Am J Ophthalmol* 1966; 62:412-35.
9. Kinsey VE. Retrolental fibroplasia; cooperative study of retrolental fibroplasia and the use of oxygen. *AMA Arch Ophthalmol* 1956; 56:481-543.
10. Patz A. Oxygen studies in retrolental fibroplasia. IV. Clinical and experimental observations. *Am J Ophthalmol* 1954; 38:291-308.
11. Lanman JT, Guy LP, Dancis J. Retrolental fibroplasia and oxygen therapy. *J Am Med Assoc* 1954; 155:223-6.
12. Schempf AH, Branum AM, Lukacs SL, Schoendorf KC. The contribution of pre-term birth to the Black-White infant mortality gap, 1990 and 2000. *Am J Public Health*. 2007 Jul;97(7):1255-60.
13. Aylward GP, Pfeiffer SI, Wright A, Verhulst SJ. Outcome studies of low birth weight infants published in the last decade: a metaanalysis. *J Pediatr*. 1989 Oct;115(4):515-20.
14. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. Natural history ROP: ocular outcome at 5(1/2) years in premature infants with birth weight less than 1251g. *Arch Ophthalmol*. 2002;120:595-9.
15. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity ophthalmological outcomes at 10 years. *Arch Ophthalmol*. 2001;119(8):1110-8.
16. The laser ROP study group. Laser therapy for retinopathy of prematurity. *Arch. Ophthalmol*. 1994;112:154-156.
17. Reynolds JD, Dobson V, Quinn GE, Fielder AR, Palmer EA, Saunders RA, Hardy RJ, Phelps DL, Baker JD, Trese MT, Schaffer D, Tung B, CRYO-ROP and

- LIGHT-ROP Cooperative Study Groups. Evidence-based screening criteria for retinopathy of prematurity: natural history data from the CRYO-ROP and LIGHT-ROP studies. *Arch Ophthalmol* 2002; 120:1470-6.
18. Repka M.X., White G.E.: Randomized comparison of diode laser photocoagulation versus cryotherapy for threshold retinopathy of prematurity. Three year outcome. *Invest. Ophth. Vis. Science* 1996;37(ARVO suppl.): 112.
  19. Early treatment for retinopathy of prematurity cooperative group. Revised indications for the treatment of retinopathy of prematurity: results of the early treatment for retinopathy of prematurity randomized trial. *Arch Ophthalmol*. 2003;121,1684-94.
  20. Ashton N, Ward B, Serpell G. Role of oxygen in the genesis of retrolental fibroplasia; a preliminary report. *Br J Ophthalmol* 1953; 37:513-20.
  21. Ashton N, Cook C. Direct observation of the effect of oxygen on developing vessels: preliminary report. *Br J Ophthalmol* 1954;38:433-40.
  22. Ashton N. Oxygen and the growth and development of retinal vessels. In vivo and in vitro studies. The XX Francis I. Proctor Lecture. *Am J Ophthalmol* 1966; 62:412-35.
  23. Kretzer FL, Hittner HM. Retinopathy of prematurity: clinical implications of retinal development. *Arch Dis Child*. 1988 Oct;63(10 Spec No):1151-67.
  24. Kretzer FL, Hittner HM. Spindle cells and retinopathy of prematurity: interpretations and predictions. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1988;24(1):147-68. Review.
  25. Kretzer FL, McPherson AR, Hittner HM. An interpretation of retinopathy of prematurity in terms of spindle cells: relationship to vitamin E prophylaxis and cryotherapy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1986;224(3):205-14
  26. Penn JS, Thum LA. Oxygen-induced retinopathy in the rat. *Basic Life Sci* 1988; 49:1025-8.
  27. Madan A, Penn JS. Animal models of oxygen-induced retinopathy. *Front Biosci* 2003; 8:1030-43.
  28. Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, Gragoudas ES, Ferrara N, Folkman J, D'Amore PA, Miller JW. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:66-71.
  29. Provis JM, Leech J, Diaz CM, Penfold PL, Stone J, Keshet E. Development of the human retinal vasculature: cellular relations and VEGF expression. *Exp Eye Res* 1997 Oct;65(4):555-68.
  30. Hughes S, Yang H, Chan-Ling T. Vascularization of the Human Fetal Retina: Roles of Vasculogenesis and Angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:1217-1228

31. 52Chan-Ling T, McLeod DS, Hughes S, Baxter L, Chu Y, Hasegawa T, Luttly GA. Astrocyte–Endothelial Cell Relationships during Human Retinal Vascular Development. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:2020–2032
32. 53McLeod DS, Hasegawa T, Prow T, Merges C, Luttly GA. The Initial Fetal Human Retinal Vasculature Develops by Vasculogenesis. *Developmental Dynamics*. 2006;235:3336–3347
33. 54Bhisitkul RB. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol*. 2006 Dec;90(12):1542-7. Review.
34. 55Chan-Ling T, Stone J. Retinopathy of prematurity: origins in the architecture of the retina. *Prog Retin Eye Res* 1993; 12:155-78.
35. 56Chan-Ling T. Glial, neuronal and vascular interactions in the mammali retina. *Prog Retin Eye Res* 1994; 13:357-89.
36. 57Chan-Ling T, Gock B, Stone J. The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that ‘physiological hypoxia’ is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:1201-14.
37. 58Smith LEH, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D’Amato R, Sullivan R, D’Amore PA. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:101-11.
38. 59Smith LEH, Kopchick JJ, Chen W, Knapp J, Kinose F, Daley D, Foley E, Smith RG, Schaeffer JM. Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science* 1997; 276:1706-9.
39. 30Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. Multicentre trial for cryotherapy for retinopathy of prematurity: three-month outcome. *Arch Ophthalmol* 1990;108: 195–204.
40. 60Smith LEH, Chen J. Retinopathy of Prematurity. *Angiogenesis*. 2007;10:133–140
41. 61Michaelson IC, Herz N, Lewkowitz E, Kertesz D. Effect of increased oxygen on the development of the retinal vessels; an experimental study. *Br J Ophthalmol*. 1954 Oct;38(10):577-87.
42. 62Alon T, Hemo I, Itin A, Pe’er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995; 1:1024-8.
43. 63Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LE. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:10457-61.
44. 64Chow LC, Wright KW, Sola A, CSMC Oxygen Administration Study Group. Can changes in clinical practice decrease the incidence of severe retinopathy of prematurity in very low birth weight infants? *Pediatrics* 2003; 111:339-45.

45. 65Cole CH, Wright KW, Tarnow-Mordi W, Phelps DL, Pulse Oximetry Saturation Trial for Prevention of Retinopathy of Prematurity Planning Study Group. Resolving our uncertainty about oxygen therapy. *Pediatrics* 2003; 112:1415-9.
46. 66Flynn JT, Bancalari E. On "supplemental therapeutic oxygen for prethreshold retinopathy of prematurity (STOP-ROP), a randomized, controlled trial. I: Primary outcomes". *J AAPOS*. 2000 Apr;4(2):65-6.
47. 67Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, Xu X, Robinson G, Driver S, Bischoff J, Zhang B, Schaeffer JM, Senger DR. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat Med* 1999;5:1390–1395
48. 68Kondo T, Vicent D, Suzuma K, Yanagisawa M, King GL, Holzenberger M, Kahn CR Knockout of insulin and IGF-1 receptors on vascular endothelial cells protects against retinal neovascularization. *J Clin Invest*. 2003; 111:1835–1842
49. 69Hellstrom A, Perruzzi C, Ju M, Engstrom E, Hard AL, Liu JL, Albertsson-Wikland K, Carlsson B, Niklasson A, Sjodell L, LeRoith D, Senger DR, Smith LE Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:5804–5808
50. 70Bizzarro MJ, Hussain N., Jonson B., et al. Genetic susceptibility to retinopathy of prematurity. *Pediatrics* 2006.
51. 42Smith L. Through The Eyes of a Child: Understanding Retinopathy through ROP. The Friedenwald lecture. *IOVS*;2008:5177-5182
52. 43Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group.. The Incidence and Course of Retinopathy of Prematurity: Findings From the Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Study. *Pediatrics* 2005;116:15-23.
53. 44Gruppo di studio italiano per la ROP. ROP up to date. Editeam, Milano 1996:1-55.
54. 45Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. An International Classification of Retinopathy of Prematurity. *Arch Ophthalmol*. 1984;102:1130-1134
55. 46ICROP Committee for Classification of Late Stages ROP. An International Classification of Retinopathy of Prematurity, II: the classification of retinal detachment. *Arch Ophthalmol*. 1987;105:906-912
56. 47International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Arch Ophthalmol*. 2006 Nov;124(11):1669-70.
57. 48Mukherjee AN, Watts P, Al-Madfai H, Manoj B, Roberts D. Impact of retinopathy of prematurity screening examination on cardiorespiratory indices: a comparison of indirect ophthalmoscopy and retcam imaging. *Ophthalmology*. 2006;113(9):1547-52.

58. 49Wallace DK, Quinn GE, Freedman SF, Chiang MF. Agreement among pediatric ophthalmologists in diagnosing plus and pre-plus disease in retinopathy of prematurity. *J AAPOS*;2008 12(4):352-6.
59. 50Wallace DK, Zhao Z, Freedman SF. A pilot study using "ROPtool" to quantify plus disease in retinopathy of prematurity. *J AAPOS*. 2007 Aug;11(4):381-7.
60. 71Screening examination of premature infants for retinopathy of prematurity. A joint statement of the American Academy of Pediatrics, the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus, and the American Academy of Ophthalmology. *Pediatrics* 1997 Aug;100(2 Pt 1):273.
61. 72Screening examination of premature infants for retinopathy of prematurity. *Pediatrics* 2001 Sep;108(3):809-11.
62. 73Screening examination of premature infants for retinopathy of prematurity. *Pediatrics* 2006 Feb;117(2):572-6.
63. 74Löfqvist C, Hansen-Pupp I, Andersson E, Holm K, Smith LE, Ley D, Hellström A. Validation of a new retinopathy of prematurity screening method monitoring longitudinal postnatal weight and insulinlike growth factor I. *Arch Ophthalmol*. 2009 May;127(5):622-7.
64. 75Smith LEH, Löfqvist C, Hellström A, Hård A-L, Engström E, Niklasson A, Andersson E. Early Weight Gain Predicts Retinopathy in Preterm Infants: New, Simple, Efficient Approach to Screening. *Pediatrics* 2009;123:638-645.
65. 31Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. 15-year outcomes following threshold retinopathy of prematurity. Final results from the multicentre trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 2005;123: 311–8.
66. 32STOP-ROP. Multicentre Study Group. Supplemental therapeutic oxygen for prethreshold retinopathy of prematurity. (STOPROP), a randomized, controlled trial. I: preliminary outcomes. *Pediatrics* 2000;105:295–310.
67. 33White JE, Repka MX. Randomized comparison of laser photocoagulation versus cryotherapy for threshold retinopathy of prematurity: 3-year outcome. *JPOS* 1997;34:83–7.
68. 34Paysse EA, Lindsey JL, Coats DK, Contant Jr CF, Steinkuller PG. Therapeutic outcomes of cryotherapy versus transpupillary diode laser photocoagulation for threshold retinopathy of prematurity. *J AAPOS* 1999;3:234–40.
69. 35Banach MJ, Ferrone PJ, Trese MT. A comparison of dense versus less dense diode laser photocoagulation patterns for threshold retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 2000;107:324–8.
70. 36Rezai KA, Elliott D, Ferrone PJ, Kim RW. Near confluent laser photocoagulation for the treatment of threshold retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 2005;123:621–6.

71. 37Kaiser RS, Trese MT. Iris atrophy, cataracts, and hypotony following peripheral ablation for threshold retinopathy of prematurity. *Arch of Ophthalmol* 2001;119:615–7.
72. 38Machemer R, deJuan E. Retinopathy of prematurity: approaches to surgical therapy. *Aust N Z J Ophthalmol* 1990;18:47–56.
73. 39Trese MT, Droste PJ. Long-term postoperative results of a consecutive series of stages 4 and 5 retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 1998;105:992–7.
74. 40Capone Jr A, Trese MT. Lens-sparing vitreous surgery for tractional stage 4A retinopathy of prematurity retinal detachments. *Ophthalmology* 2001;108:2068–70.
75. 41Prenner JL, Capone Jr A, Trese MT. Visual outcomes after lens-sparing vitrectomy for stage 4A retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 2004;111:2271–3.
76. 76Stone J, Itin A, Alon T, et al. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* 1995;15:4738–4747.
77. 77Chiang MF, Jiang L, Gelman R, et al. Interexpert agreement of plus disease diagnosis in retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 2007;125:875–880.
78. 78Averbukh E. The evidence supporting the early treatment for type 1 retinopathy of prematurity needs further evaluation. *Arch Ophthalmol* 2005;123:409–410.
79. 79Coats D, Saunders R. The dilemma of exercising clinical judgment in the treatment of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 2005;123:408–409.
80. 80Jalali S, Essuman VA, Thomas R. Clinical application of the revised indications for the treatment of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 2005;123:407–408.
81. 81Vander JF, McNamara JA, Tasman W, Brown GC. Revised indications for early treatment of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 2005;123:406–407.
82. 82Axer-Siegel R, Snir M, Cotlear D, et al. Diode laser treatment of posterior retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol* 2000;84:1383–1386.
83. 83O’Keefe M, Lanigan B, Long VW. Outcome of zone I retinopathy of prematurity. *Acta Ophthalmol Scand* 2003;81:614–616.
84. 84Re’csa’n Z, Va’mos R, Salacz G. Laser treatment of zone I prethreshold and stage 3 threshold retinopathy of prematurity. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2003;40:204–207.
85. 85Katz X, Kychenthal A, Dorta P. Zone I retinopathy of prematurity. *J Am Assoc Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2004;4:373–376.
86. 86Kychenthal A, Dorta P, Katz X. Zone I retinopathy of prematurity: clinical characteristics and treatment outcomes. *Retina* 2006;26:S11–S15.

87. 87Spencer R. Long-term visual outcomes in extremely low birth-weight children (an American Ophthalmological Society Thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006;104:493–516.
88. 88Chung EJ, Kim JH, Ahn HS, Koh HJ. Combination of laser photocoagulation and intravitreal bevacizumab (Avastin®) for aggressive zone I retinopathy of prematurity. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:1727–1730.
89. 89Travassos A, Teixeira S, Ferreira P, et al. Intravitreal bevacizumab in aggressive posterior retinopathy of prematurity. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2007;38:233–237.
90. 90Shah PK, Narendran V, Tawansy KA, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for post laser anterior segment ischemia in aggressive posterior retinopathy of prematurity. *Indian J Ophthalmol* 2007;55:75–76.
91. 91Mintz-Hittner HA, Kuffel RR, jr., et al. Intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for treatment of stage 3 retinopathy of prematurity in zone I or posterior zone II. *Retina* 28:831–838, 2008
92. 92Lalwani GA, Puliafito C, et al. Off-label use of intravitreal bevacizumab (Avastin) for salvage treatment in progressive threshold retinopathy of prematurity. *Retina* 28:S13–S18, 2008
93. 93Quiroz-Mercado H, Martinez-Castellanos MA, et al. Antiangiogenic therapy with intravitreal bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Retina* 28:S19–S25, 2008
94. 94Kusaka S, Shima C, Wada K, et al. Efficacy of intravitreal injection of bevacizumab for severe retinopathy of prematurity: a pilot study. *Br J Ophthalmol* 2008;92:1450–1455.
95. 95Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM, Pulido JS, Singh RJ. Pharmacokinetics of Intravitreal Bevacizumab (Avastin). *Ophthalmology* 2007;114:855–859
96. 96Geisen P, Peterson LJ, Martiniuk D, Uppal A, Saito Y, Hartnett ME. Neutralizing antibody to VEGF reduces intravitreal neovascularization and may not interfere with ongoing intraretinal vascularization in a rat model of retinopathy of prematurity. *Mol Vis*. 2008 Feb 11;14:345-57.
97. 97Mintz-Hittner HA, Kretzer FL. Postnatal retinal vascularization in former pre-term infants with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 1994;101:548–558.